ВИТАМИН

Д

ВИТАМИН

С чувством
глубокой симпатии
дорогим Юре и Ирине
от автора. Ведь
витамин Д – это вещь.

[signature]

23.I.1975 г.

МИНИСТЕР
НАУЧНО-ИССЛ
КАЗАХСКИЙ

П. В. СЕР

Издател

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КАЗАХСКОЙ ССР
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КРАЕВОЙ ПАТОЛОГИИ
КАЗАХСКИЙ ФИЛИАЛ ИНСТИТУТА ПИТАНИЯ АМН СССР

П. В. СЕРГЕЕВ, Ш. С. ТАЖИБАЕВ, Р. Д. СЕЙФУЛЛА

ВИТАМИН Д

Издательство «НАУКА» Казахской ССР
АЛМА-АТА · 1974

УДК 615.857.061.2

Книга представляет собой систематическое изложение современных данных мировой литературы о витаминах группы Д. В ней рассмотрены теоретические основы механизма действия и некоторые вопросы клинического применения данного витамина. Определенное место в монографии занимает обзор результатов собственных исследований авторов. Рассматриваются вопросы взаимосвязи между химическим строением и биологической активностью витаминов группы Д. Широко представлены данные о метаболизме витамина Д и механизме его действия. Излагается новый подход к выяснению характера действия витамина Д, согласно которому активной является не сама молекула витамина, а его метаболит или метаболиты, причем данный витамин, подобно стероидным гормонам, проявляет свое физиологическое действие на уровне генетического аппарата клеток органов-мишеней. В связи с этой концепцией рассмотрены возможные биохимические основы гипо- и гипервитаминозов Д, а также резистентных к данному витамину рахитоподобных заболеваний.

Книга рассчитана на научных работников, занимающихся вопросами витаминологии, и практических врачей.

Илл. 9, табл. 34, библ.: отечеств. — 126, иностр. — 449 назв.

Ответственный редактор
доктор медицинских наук
профессор Т. Ш. ШАРМАНОВ

$С\frac{50700-106}{м\ 405(07)-74}$ ДП—74

© Издательство «Наука» Казахской ССР. 1974 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 3

Глава I. **Физико-химические свойства и биологическая активность витамина Д** 5

Глава II. **Метаболизм витамина Д и его обменно-активные формы** 15

Биосинтез витамина Д 16

Всасывание витамина Д 19

Транспорт витамина Д 23

Выделение витамина Д и его метаболитов из организма . . 26

Тканевое распределение витамина Д 31

Субклеточное распределение витамина Д 39

Метаболиты витамина Д 50

Глава III. **Влияние витамина Д на метаболизм белка и нуклеиновых кислот** 74

Взаимодействие витамина Д и актиномицина Д 74

Регуляция витамином Д обмена нуклеиновых кислот . . 80

Участие витамина Д в регуляции обмена белка . . . 96

Глава IV. **Влияние витамина Д на абсорбцию кальция в кишечнике** 121

Физиологический механизм абсорбции кальция в кишечнике 122

Механизм действия витамина Д на абсорбцию кальция . . . 126

Глава V. **Влияние витамина Д на метаболизм костной ткани** 145

Глава VI. **Токсическое действие витамина Д** 161

Некоторые вопросы патогенеза, клиники и диагностики Д-гипервитаминоза 163

Минеральный обмен при гипервитаминозе Д 171

Углеводный обмен при гипервитаминозе Д 192

Механизм токсического действия витамина Д 194

Заключение 201

Литература 206

ВВЕДЕНИЕ

Витамин Д представляет собой соединение стероидной структуры, которое является предметом исследования биологов и медиков различных специальностей. До последнего времени исследование механизма действия витамина Д на молекулярном уровне проводилось в ограниченном масштабе.

Мы считаем нужным оговориться, что название «витамин Д» включает собирательные понятия, так как в природе существует по крайней мере 7 витаминов Д, и биологическое действие проявляют не сами витамины Д, а их активные метаболиты. Хотя витамин Д не образуется в какой-либо железе, а синтезируется в клетках эпителия кожи и, возможно, в печени, мы полагаем, что он по ряду своих параметров может быть отнесен скорее к гормонам стероидной структуры, чем к витаминам. Собственные наблюдения и анализ литературных данных привели нас к следующему заключению:

1. Витамин Д относится к стероидным производным и синтезируется из ацетата и холестерина в организме подобно тому, как синтезируются стероидные гормоны.

2. Витамин Д, как и стероидные гормоны, оказывает свое действие на расстоянии от места синтеза, имеет свои органы-мишени, рецепторные молекулы и распределяется в организме подобно стероидам.

3. Витамин Д метаболизируется в организме в активные соединения подобно стероидным гормонам и выводится из организма в форме конъюгатов стероидов.

4. Молекулярные механизмы действия витамина Д сходны с таковыми у стероидных гормонов. Он влияет на биологические мембраны и генетический аппарат клеток органов-мишеней и регулирует синтез специфических белковых молекул, связывающих Ca^{2+}.

5. Избыток или недостаток витамина Д приводит к сдвигу метаболизма других стероидов.

Наша точка зрения согласуется с представлениями некоторых других авторов, рассматривающих гормональную природу витамина Д. Во всяком случае, в настоящее время не представляется возможным выделить витамины группы Д из класса стероидных гормонов как с позиции их метаболической трансформации, так и по механизмам действия.

В монографии освещены вопросы, касающиеся физико-химических свойств витамина Д, специфики молекулярных механизмов действия на мембраны клеток, генетический аппарат, синтез белка, транспорт ионов, костную ткань. Уделено внимание проявлениям токсического действия витамина Д.

Мы полагаем, что представленные нами сведения о витамине Д помогут клиницистам понять молекулярную сущность рахита — весьма распространенного заболевания среди детей, а также гипервитаминозов Д.

В связи с ограниченным объемом данная монография не претендует на исчерпывающее освещение всех аспектов действия витамина Д в эксперименте и клинике. Авторы ставили перед собой задачу — осветить наиболее общие и важные стороны его фармакодинамики.

Глава I

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВИТАМИНА Д

Издавна известно заболевание, развивающееся в младенческом возрасте и характеризующееся нарушением развития костной системы — рахит. Было замечено, что солнечные лучи, а также добавление к пище жира печени трески оказывают благоприятное действие при заболеваниях рахитом. Экспериментальные исследования показали, что облучение пищи, получаемой рахитичными животными, оказывает такое же лечебное действие, как облучение самих животных. Эти данные привели к предположению, что причиной болезни является недостаток какого-то антирахитического вещества, известного сейчас как витамин Д, который образуется в организме под действием солнечных лучей или поступает с пищей. Эти наблюдения положили начало дальнейшим исследованиям, направленным на обнаружение, выделение, идентификацию и синтез антирахитического вещества.

Утверждение, что при ультрафиолетовом облучении фитостерин (смесь растительных стеринов) (Hess, Weinstock, 1924, 1925) и холестерин (Steenbock, Black, 1925; Rosenheim, Webster, 1925) приобретают антирахитические свойства, дало основание предполагать, что эти стерины содержат провитамин, который превращается в витамин при облучении. Интенсивные исследования, начатые в эти годы с эргостерином, выделенным из спорыньи, привели к тому, что в 1931 г. в двух разных лабораториях при ультрафиолетовом облучении эргостерина было получено очищенное соединение с высоким антирахитическим действием (Windaus a. oth., 1931; Angus a. oth., 1931). Это соединение было названо витамином $Д_1$. Вскоре было обнаружено, что витамин

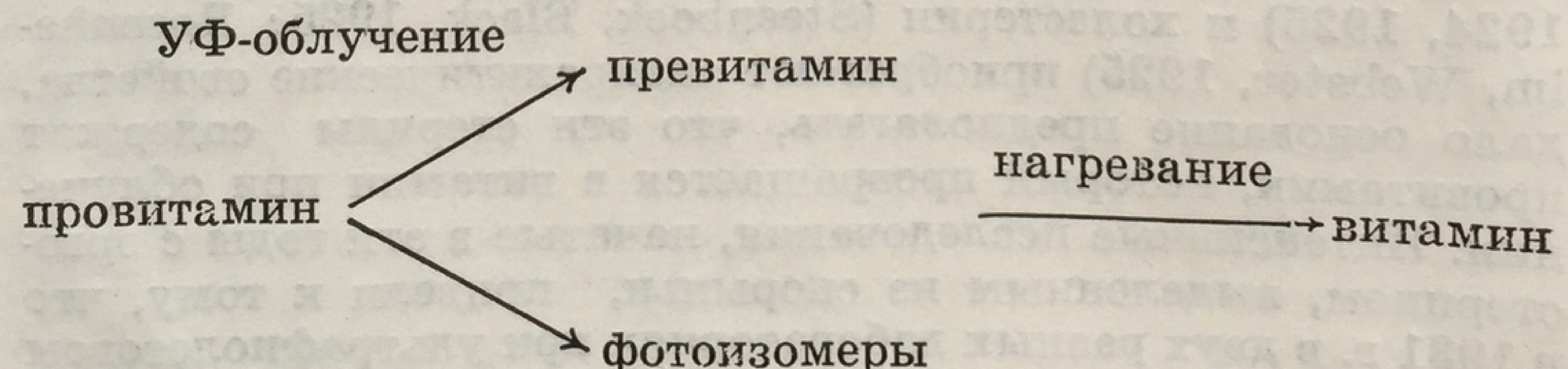
Д$_1$ является эквимолекулярным компонентом витамина Д$_2$ с люмистерином (Windaus a. oth., 1932).

Облученный эргостерин в опытах на цыплятах имел во много раз меньшую антирахитическую активность по сравнению с его действием на крыс. Однако непосредственное облучение рахитичных цыплят приводило к их выздоровлению. Было выявлено, что облученный холестерин более эффективен как антирахитический агент для цыплят, чем облученный эргостерин. На основании этих данных сделано заключение, что в холестерине содержится другой, отличный от эргостерина, провитамин, который оказался 7-дегидрохолестерином. Чистый витамин Д$_3$ был выделен в кристаллическом виде при облучении 7-дегидрохолестерина (Schenk, 1937). При УФ-облучении 22-дигидроэргостерина получен витамин Д$_4$.

Выделение в чистом виде, установление химической структуры и осуществление синтеза витамина Д дали возможность для дальнейшего прогресса в изучении механизма его действия, а также для широкого применения данного витамина в медицинской и ветеринарной практике.

В настоящее время известен ряд природных и синтезированных химических соединений, относящихся к витаминам группы Д. Природными являются витамины Д$_2$, Д$_3$, Д$_4$, Д$_6$ и Д$_7$. Все они обнаружены в естественных источниках. Витамин Д$_5$ получен синтетическим путем.

Для витаминов группы Д характерно то, что они образуются при ультрафиолетовом облучении соответствующих провитаминов стеринового ряда. Таким действием обладают ультрафиолетовые лучи с длиной волны от 253 до 330 *нм*; наибольшую эффективность имеют лучи с длиной волны около 296 *нм*. Этот процесс также сопровождается образованием различных фотоизомеров. Процесс превращения провитамина в витамин можно изобразить следующим образом:



Превитамины являются промежуточными соединениями на пути химического превращения провитамина в витамин. Можно предложить следующую классификацию соединений, имеющих отношение к витаминам группы Д.

Провитамины:

$Д_2$ (эргостерин),
$Д_3$ (7-дегидрохолестерин),
$Д_4$ (дигидроэргостерин),
$Д_5$ (7-дегидроситостерин),
$Д_6$ (7-дегидростигмастерин),
$Д_7$ (7-дегидрокампестерин).

Витамины:

$Д_2$ (эргокальциферол),
$Д_3$ (холекальциферол),
$Д_4$ (дигидроэргокальциферол),
$Д_5$ (ситокальциферол),
$Д_6$ (стигмакальциферол),
$Д_7$ (кампекальциферол).

Фотоизомеры, образующиеся при УФ-облучении провитаминов:

превитамины,
люмистерины,
тахистерины,
дигидротахистерины,
токсистерины,
супрастерины.

Витамин $Д_1$, как указано выше, оказался эквимолекулярным соединением витамина $Д_2$ и люмистерина.

Мы не ставили перед собой цель изложить в данной главе все имеющиеся сведения о физико-химических свойствах витамина Д, так как они представлены в обзорах и монографиях (Березовский, 1959; Физер Л., Физер М., 1964; Bills, 1954; Inhoffen, Irmscher, 1959; Sanders a. oth., 1969). Мы уделили внимание лишь общим принципам химического строения витамина Д и структурным особенностям его молекулы, имеющим непосредственное отношение к проявлению физиологического и фармакологического действия данного витамина.

Основу химической структуры провитаминов составляет циклопентанопергидрофенантреновое кольцо с боковой цепью при C_{17} из 8—10 углеродных атомов. Для удобства последующего изложения материала на рисунке 1 дана нумерация атомов углеродного скелета молекулы провитаминов и витаминов Д на примере 7-дегидрохолестерина и холекальциферола.

В молекуле провитаминов присутствуют три циклогексановых кольца (A, B, C) и одно циклопентановое кольцо (D). Кольцо B содержит две сопряженные двойные связи в положениях C_5—C_6 и C_7—C_8. Различные провитамины отличаются друг от друга по своей химической структуре строением боковой цепи при C_{17}.

В отличие от них молекулы витаминов Д представлены двумя циклогексановыми кольцами (A и C), одним циклопентановым кольцом (D) и боковой цепью соответствующего провитамина. Кольцо B у провитаминов при воздействии УФ-излучения размыкается в положении C_9—C_{10} и в молекуле витамина Д отсутствует. Разрыв кольца B сопровож-

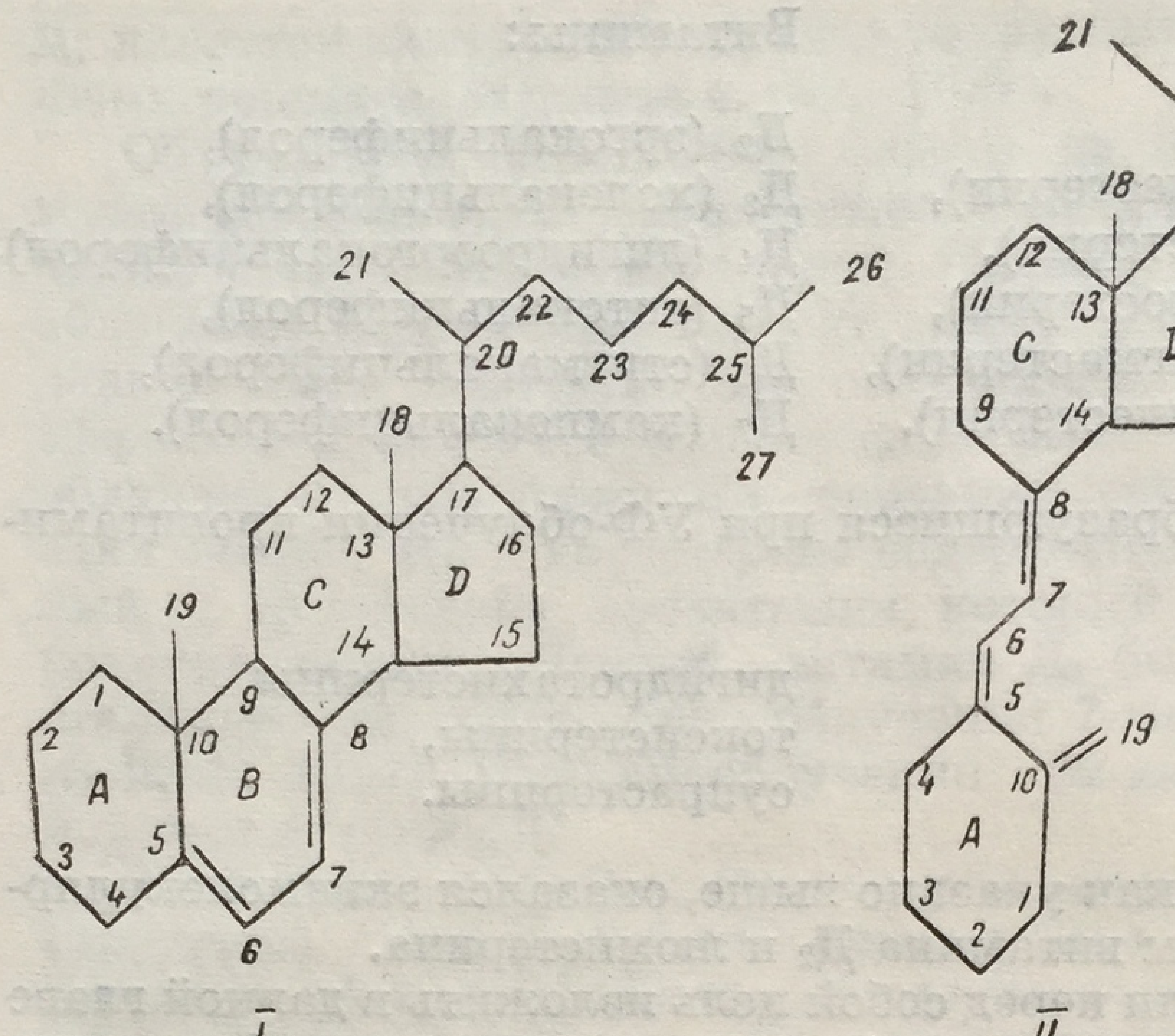


Рис. 1. Нумерация углеродных атомов провитамина и витамина Д на примере 7-дегидрохолестерина (I) и холекальциферола (II).

дается появлением дополнительной двойной связи C_{10}—C_{19}. Следовательно, кольцо А молекулы витамина связывается с кольцом С системой углеродных атомов, имеющей две двойные связи (C_5—C_6 и C_7—C_8). Молекулы витамина Д, так же как и провитамины, содержат одну гидроксильную группу при C_3.

Таким образом, витамины Д отличаются по своей химической структуре от соответствующих провитаминов размыканием и отсутствием кольца В с появлением дополнительной двойной связи.

Конформация шестичленных колец А и С молекулы витамина Д представлена формой «кресла», которая является энергетически более выгодной, чем форма «ванны» (Rasmussen, 1943; Hassel, Ottar, 1947; Hassel, Viervoll, 1947). Кольца С и D сформированы *транс*-сочленением. Боковая цепь у C_{17} и метильная группа у C_{13} пространственно представляют *цис*-(β)-конформацию. При размыкании кольца В сохраняются многие характерные для провитаминов пространственные конфигурации, не затрагиваемые расщеплением молекулы.

Важным обстоятельством является то, что разрыв кольца В и связанные с этим изменения структуры и конформации молекулы провитамина необходимы для проявления

физиологического действия витамина. Провитамины с замкнутым кольцом В, как известно, не обладают антирахитической активностью.

Для витаминов группы Д характерна строго определенная локализация двойных связей, а именно C_5—C_6; C_7—C_8; C_{10}—C_{19}. Тахистерин, отличающийся от витамина Д иным расположением двойных связей (C_1—C_5; C_6—C_7; C_8—C_9), обладает лишь незначительной биологической активностью (Meunier, Thibaudet, 1946). Эти данные о существенном влиянии сопряженных двойных связей на биологическую активность витамина подтвердились при изучении биологической активности дигидротахистерина. Так, дигидротахистерин, имеющий идентичную с витамином Д локализацию двойных связей, в отличие от тахистерина обладал значительной биологической активностью (Bosman, Chen, 1966).

Гидроксильная группа при C_3, по-видимому, не оказывает существенного влияния на биологическую активность витамина Д. Замена ее сульфгидрильной (Bernstein, Sax, 1951), галогенной или кето-группой (Windaus, Buckholz, 1938) не приводила к изменению активности витамина Д.

Сам факт, что различные по своей активности витамины группы Д отличаются друг от друга лишь строением боковой цепи у C_{17}, дает возможность предположить определяющую роль последней при проявлении физиологического эффекта витамина Д. Даже незначительное изменение в боковой цепи витамина Д оказывает глубокое влияние на его биологическую активность.

Витамин $Д_3$, боковая цепь которого состоит из 8 насыщенных атомов углерода, обладает наибольшей активностью. Появление двойной связи при C_{22} и метильной группы при C_{24} (витамин $Д_2$) снижает антирахитическую активность витамина для цыплят при сохранении своих свойств в отношении крыс и людей. Наличие этильной группы при C_{24} (витамины $Д_5$ и $Д_6$) значительно снижает активность витамина. При замене боковой цепи гидроксильной группой (Dimroth, Paland, 1939) или боковой цепью желчных кислот (Haslewood, 1939) соединения лишаются Д-витаминной активности.

Несомненно, большой интерес представляют работы Hibberd и Norman (1969). На основании изучения метаболизма кальция у рахитичных цыплят под влиянием витамина $Д_2$ и $Д_3$, дигидротахистеринов 2 и 3 авторы предполагают, что разные химические группировки в молекуле витамина могут быть ответственными за различные физиологические акции. В частности, соединения, имеющие боковую цепь витамина $Д_3$ или дигидротахистерина$_3$, в основном действу-

ют на процессы всасывания и транспорта ионов кальция в кишечнике, а соединения с боковой цепью витамина $Д_2$ или дигидротахистерина$_2$ оказывают преимущественное влияние на обмен кальция и костной ткани.

Интересные данные о связи химической структуры с биологическим действием получены в последние годы в связи с изучением метаболизма витамина Д в организме. Так, обнаружено, что 25-окси- и 1,25-диоксиформы витамина Д действуют быстрее и эффективнее, чем сам витамин (Blunt a. oth., 1968; Holick a. oth., 1971). Данные об этих биологически активных метаболитах более подробно излагаются ниже.

Из витаминов группы Д наиболее активными являются эргокальциферол (витамин $Д_2$) и холекальциферол (витамин $Д_3$). Они нашли также широкое практическое применение.

Точка плавления кристаллического эргокальциферола 120—121° (из метанола или ацетона), холекальциферола — 84—85°. Спектр поглощения витамина $Д_2$ и $Д_3$ в спирте, гексане или эфире имеет максимум при 265 *нм*, обязанный своим происхождением наличию триеновой связи.

Кальциферолы практически нерастворимы в воде, хорошо растворимы в жирах и органических растворителях (хлороформ, эфир, спирт), неустойчивы по отношению к различным окисляющим агентам. При внесении спиртовых растворов витамина Д в воду образуются стойкие мелкодисперсные эмульсии, обладающие мицеллярной структурой (Березовский, 1959).

Инкубация витамина Д в водной среде сопровождается быстрой утратой антирахитической активности, снижением интенсивности и сдвигом максимума поглощения к 250 *нм*, образованием перекисных и карбонильных соединений (Спиричев, Зиновьева, 1968; Спиричев и др., 1971; Chen a. oth., 1965). Образованию перекисных соединений способствует наличие в молекуле кальциферолов системы сопряженных двойных связей, легко присоединяющих кислород (Уотерс, 1966). Пропускание кислорода, повышение температуры, изменение pH в кислую сторону, добавление каталитических количеств Fe^{2+} значительно ускоряют окисление витамина Д в водной среде. ЭДТА и такие антиоксиданты, как α-токоферол, бутилокситолуол, пропилгаллат, 10-(2-диметиламинопропил)-фенотиазин, подавляют окислительные превращения витамина Д, что указывает на их свободнорадикальный характер (Спиричев и др., 1971).

Относительно устойчивы растворы кальциферолов в маслах, где витамин Д может сохраняться без потери биологи-

ческой активности в течение нескольких месяцев (Lindholm, 1944). Однако исследования последних лет (Блажеевич, 1969; Спиричев, 1971) свидетельствуют о стимуляции витамином Д аутоокисления липидов с образованием перекисных соединений, являющихся токсичными для организма (Воскресенский, Левицкий, 1970). Это обстоятельство должно быть учтено при использовании масляных препаратов витамина Д и должно послужить стимулом для разработки способов торможения процессов переокисления в этих препаратах, возможно, с помощью антиоксидантов (Журикова и др., 1971).

Кристаллические препараты кальциферолов и их растворы в органических растворителях менее устойчивы по сравнению с масляными растворами и легко подвергаются инактивации при действии кислорода воздуха, тепла и света (Березовский, 1959).

Характерной особенностью витамина Д является его чрезвычайно высокая биологическая активность. Антирахитическая активность витаминов группы Д измеряется в международных (интернациональных) единицах (МЕ). Принято считать, что 1 МЕ соответствует специфической активности 0,025 *мкг* кристаллического холекальциферола.

Оценка Д-витаминной активности соединений заключается в установлении лечебного (в течение 7 дней) эффекта на рахитичных крысах или профилактического (в течение 21 дня) эффекта на цыплятах, находящихся на рахитогенной диете. При этом критериями биологического действия витамина Д служат клинические признаки, рентгенологические показатели состояния костной системы, концентрация сывороточного кальция, фосфора и другие показатели. Оба метода являются трудоемкими, требуют много времени и позволяют обнаружить присутствие 1—10 МЕ витамина Д.

Существуют и косвенные методы определения Д-витаминной активности, основанные на способности витамина Д ускорять кишечную абсорбцию кальция и мобилизацию костного минерала. Более чувствительным из этих методов является определение кишечного транспорта радиоактивного кальция у рахитичных животных с использованием методики «вывернутой кишечной петли». Влияние витамина Д на мобилизацию костного минерала может быть выявлено путем определения содержания кальция в сыворотке крови рахитичных животных, содержащихся на безкальциевой или низкокальциевой диете, т. е. когда исключается эффект витамина Д на абсорбцию экзогенного кальция в кишечнике. Однако в последнем случае не устраняется действие витамина Д на кишечную реабсорбцию эндогенно-

го кальция, что может, вероятно, влиять на концентрацию сывороточного кальция.

Витамины группы Д обладают разной биологической активностью. Однако этот вопрос до настоящего времени еще недостаточно изучен, и в литературе имеется много противоречивых данных об антирахитической активности различных витаминов Д. В таблице 1 суммированы литературные сведения о биологической активности витаминов группы Д. Данные таблицы свидетельствуют, что небольшие сдвиги в химической структуре боковой цепи витамина Д обусловливают значительные различия в биологической активности.

Таблица 1

Биологическая активность витаминов группы Д

Название	Строение углеродной цепи $C_{22}-C_{24}$	Активность			
		МЕ/*мкг*		%	
		Крысы	Цыплята	Крысы	Цыплята
Холекальциферол ($Д_3$)	$-CH_2-CH_2-CH_2-$	40*	40	100	100
Эргокальциферол ($Д_2$)	$-CH{=}CH-CH(CH_3)-$	40	4	100	10
Дигидроэргокальциферол ($Д_4$)	$-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$	20—30	8	50—75	20
Ситокальциферол ($Д_5$)	$-CH_2-CH_2-CH(C_2H_5)-$	14	2—4	10	5—10
Стигмакальциферол ($Д_6$)	$-CH{=}CH-CH(C_2H_5)-$	2	?	5	?
Кампекальциферол ($Д_7$)	$-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$	4	?	10	?

* По некоторым данным, на организм человека и крыс активнее влияет холекальциферол, чем эргокальциферол.

Одним из интересных, но еще не выясненных вопросов является различная видовая чувствительность животных к витаминам группы Д. Витамины $Д_2$ и $Д_3$ имеют равную антирахитическую активность для людей (Brockmann, 1937), кроликов (Kato, 1966) и крыс (Chen, Bosman, 1964). Однако эти витамины как антирахитические агенты не равнознач-

ны для цыплят (Chen, Bosman, 1964; Hurwitz a. oth., 1967; Hibberd, Norman, 1969). Для рахитичных цыплят витамин $Д_2$ проявляет антирахитическую активность в 10 раз меньшую, чем витамин $Д_3$, в то время как для крыс эти две формы почти равнозначны.

Выраженное различие в действии эргокальциферола и холекальциферола обнаружено и у некоторых видов южноамериканских приматов (Hunt a. oth., 1969). Авторы показали, что процесс всасывания Ca^{47} в кишечнике и поглощение его костями черепа было более высоким у обезьян, получавших холекальциферол, чем при употреблении эргокальциферола. Витамин $Д_3$ в большей степени, чем витамин $Д_2$, способствовал задержке кальция в организме. Это было обнаружено по уменьшению выведения Ca^{47} с калом и мочой. Таким образом, холекальциферол у приматов оказался более активным, чем эргокальциферол, в стимуляции кишечной абсорбции как экзогенного, так и эндогенного кальция, а также процессов минерализации костной ткани. Витамин $Д_2$ не эффективен или значительно менее активен, чем витамин $Д_3$, в предотвращении рахита, остеомаляции, фиброзной остеодистрофии у приматов.

Различием в действии на птиц и млекопитающих обладают не только витамины $Д_2$ и $Д_3$. Так, 22-дигидроэргокальциферол (витамин $Д_4$) оказался значительно более активным для крыс, чем для цыплят (Grab, 1936; Mc Donald, 1936).

Для люмистерина$_2$ и люмистерина$_3$ характерна очень слабая антирахитическая активность по отношению к крысам и сравнительно высокая при испытании их действия на цыплятах (Белявская, Вендт, 1967). Кроме того, люмистерин$_3$ в опытах на цыплятах оказался приблизительно в 30 раз активнее люмистерина$_2$, т. е. соотношение их активности подобно таковой у витаминов $Д_3$ и $Д_2$.

Таким образом, имеется достаточное количество исследований, свидетельствующих о наличии видовой чувствительности животных к различным витаминам группы Д. По-видимому, подобные различия могут быть обусловлены особенностями метаболизма витамина Д в организме разных видов животных. Названное предположение в некоторой степени подтверждается результатами исследований последних лет. Эти сведения приводятся нами ниже.

Суммируя изложенное, можно сказать, что большим достижением явилось установление химической структуры витаминов группы Д, что обусловило возможность химического синтеза, производства и широкого практического применения витамина Д. Химическая структура витаминов Д тесно взаимосвязана не только с их биологической актив-

ностью вообще, но и обусловливает видовые различия чувствительности животных к данному витамину.

В последние годы появились данные, свидетельствующие, что активным является не сам витамин Д, а его метаболит (или метаболиты). В связи с этим представляет большой интерес дальнейшее изучение метаболизма витамина Д, в частности выяснение связи химической структуры с физиологическим действием витамина Д и его обменно-активных форм. Это, в свою очередь, может позволить осуществлять направленный синтез высокоактивных препаратов со специфическим действием.

Глава II

МЕТАБОЛИЗМ ВИТАМИНА Д И ЕГО ОБМЕННО-АКТИВНЫЕ ФОРМЫ

Изучение метаболизма витамина Д представляет большой интерес в разрешении ряда важных вопросов относительно выяснения механизма действия и практического применения данного витамина. Знание пути биосинтеза витамина Д и его депонирования в организме необходимо при установлении физиологической потребности, а также рациональной дозировки при профилактике и лечении Д-витаминной недостаточности с учетом конкретных условий, таких как ультрафиолетовое облучение, поступление витамина Д с пищей и т. д. Между тем все еще мало информации о синтезе и метаболизме витамина Д у людей, несмотря на обилие экспериментальных исследований на животных, клинических исследований и его широкого практического применения. Несомненно, большое значение имеют исследования органного, тканевого, клеточного и субклеточного распределения витамина в установлении органов-мишеней, для выяснения мембранного действия витамина, связывания его специфическими рецепторными молекулами и ряда других вопросов, необходимых в понимании биологических процессов, лежащих в основе физиологического действия витамина Д. Исследования в этой области стали более успешными и интенсивными, особенно в последние годы. Достигнуты определенные успехи в изучении метаболизирования витамина Д в организме в соединения более активные, чем сами витамины. Последнее сыграло определенную роль в понимании сущности латентного периода между введением витамина и проявлением его действия, в изучении видовой чувствительности к препаратам витамина, а также в выявлении механизмов развития и терапии

некоторых витамин Д-резистентных рахитогенных заболеваний. Изучение биологически активных метаболитов, выделение их в чистом виде и осуществление их синтеза создают определенные предпосылки для возможного производства более активных и специфически действующих препаратов.

Биосинтез витамина Д

Возможность вылечивания рахита путем солнечных или ультрафиолетовых облучений показана как в эксперименте на животных, так и у людей (Steenbock, 1924 и др.). Эти данные легли в основу предположения, что в организме синтезируются вещества, превращающиеся при воздействии ультрафиолетовыми лучами в витамин Д. О наличии эндогенного синтеза витамина Д свидетельствуют также данные, что жир печени трески (рыбий жир) и некоторые другие продукты животного происхождения обладают антирахитической активностью. В дальнейшем было установлено, что в коже крыс (Cruickshank, Kodicek, 1955) и людей (Bekemeier, 1958) синтезируется витамин $Д_3$ из 7-дегидрохолестерина (провитамин $Д_3$). Последний образуется в организме путем окисления холестерина и депонируется в основном в коже. Под воздействием ультрафиолетовых лучей (253—330 *нм*) происходит размыкание кольца в молекуле 7-дегидрохолестерина и превращение его в витамин $Д_3$. Ежедневно в коже человека синтезируется в среднем 1—2 МЕ/$см^2$ (кожи) холекальциферола (Bekemeier, 1958). Скорость синтеза в различных участках неодинакова и имеет максимальную величину в коже спины (15 МЕ/$см^2$ в день). 7-дегидрохолестерин и витамин $Д_3$ в коже человека идентифицированы по данным газовой и тонкослойной хроматографии и масс-спектрального анализа липидных экстрактов кожи (Rauschkolb a. oth., 1969). Полученные авторами результаты свидетельствуют, что средний уровень содержания витамина $Д_3$ в коже живота человека достигает 3,2 γ/*г*.

Изложенные данные свидетельствуют о довольно высокой скорости биосинтеза витамина $Д_3$ в человеческом организме при наличии ультрафиолетового облучения. Этим, по-видимому, объясняется благотворное влияние солнечных лучей на больных рахитом. Становится ясным факт, что взрослый организм в условиях достаточного ультрафиолетового облучения полностью обеспечивает себя витамином Д и не нуждается в дополнительном поступлении его с пищей.

Количество синтезируемого в коже витамина Д зависит от интенсивности и длительности ультрафиолетового облучения. Поскольку эти условия варьируют в значительных пределах, естественно предполагать наличие в организме какой-то системы контроля, обеспечивающей биосинтез витамина Д в физиологических границах. В последние годы (Loomis, 1967; Bekemeier, 1969) высказывается предположение о возможной роли кожного пигмента в регуляции биосинтеза витамина Д у людей. Известно, что способность к образованию витамина Д пигментированной кожей снижена по сравнению с непигментированной, так как 50—75% витамина Д синтезируется глубже пигментного слоя, а последний интенсивно поглощает ультрафиолетовые лучи. Основываясь на этих данных, авторы высказывают предположение, что в доисторические времена при расселении людей с пигментированной кожей из тропиков в области с пониженной инсоляцией (более высокие широты) Д-гиповитаминоз (вследствие сильной пигментации кожи и пониженной инсоляции) служил фактором естественного отбора и постепенного появления популяций с малопигментированной кожей. Таким образом, постепенная депигментация кожи, возможно, является фактором приспособления к жизни в более высоких широтах, где пониженная по сравнению с тропиками инсоляция требует повышенной способности к фотосинтезу витамина Д. Возможно также, что усиление кожной пигментации является фактором, ограничивающим биосинтез витамина Д в чрезмерных количествах в условиях повышенной инсоляции.

Как указывалось, печень трески обладает выраженной антирахитической активностью. Готовый витамин $Д_3$ содержится в значительных количествах и у некоторых других видов глубоководных рыб. Известно, что слой воды толщиной в 1 *м* задерживает ультрафиолетовые лучи. Отсюда естественно предположить о способности рыб к нефотохимическому синтезу витамина Д. Подобная возможность в некоторой степени подтверждается исследованиями Blondin и сотр. (1967), которые при инкубации меченого 4-C^{14}-7-дегидрохолестерина с гомогенатами печени атлантического морского окуня *Roccus saxtilis* в темноте получили радиоактивный витамин $Д_3$, идентифицированный методом газожидкостной хроматографии. Выход витамина $Д_3$ составил 0,56 МЕ/*г*/*час*. Эти данные могут свидетельствовать о наличии в печени рыб нефотохимического ферментативного пути превращения 7-дегидрохолестерина в витамин $Д_3$. Возможно, что подобная способность к ферментативному пути синтеза витамина Д характерна не только для рыб, но и для

других животных, обитающих в условиях, защищенных от доступа ультрафиолетовых лучей.

Не исключено, что некоторые виды млекопитающих также обладают способностью к нефотохимическому синтезу витамина Д. Известно, что для развития у содержащихся в темноте крыс классических скелетных нарушений, характерных для рахита, необходимо не только отсутствие витамина Д, но и определенные соотношения содержания кальция и фосфора в диете (Steenbock, Herting, 1955), а у цыплят подобные изменения в костной системе наступают независимо от соотношения кальция и фосфора в диете (Migicovsky, Emslie, 1947). Однако и у крыс и у цыплят витамин Д выполняет специфическую метаболическую функцию, необходимую для кишечной абсорбции кальция и нормального костеобразования. Возможно, что подобное различие в реакции крыс и цыплят на недостаток витамина Д обусловлено способностью крыс синтезировать некоторые количества витамина нефотохимическим путем. Разумеется, проверка такого предположения возможна путем экспериментальных исследований.

Витамин $Д_2$, как указывалось выше, образуется при ультрафиолетовом облучении широко распространенного в природе эргостерина (стерин растительного происхождения) и поступает в организм вместе с пищей как естественный продукт.

Некоторые исследователи (Вендт, 1971; Raoul a. oth., 1955, 1956, 1958) предполагают, что естественный антирахитический фактор, образующийся в животном организме, по своему химическому строению не идентичен синтетическому холекальциферолу .Обменно-активная форма витамина Д образуется непосредственно в клетках. Эти предположения основываются главным образом на следующих данных. Было обнаружено (Raoul a. oth., 1956), что при воздействии флоридина (каталитически действующий боксит из штата Флорида США, состоящий в основном из $Al_2O_3 \cdot 2H_2O$) на холестерин через ряд промежуточных соединений образуется антирахитическое вещество (идентичное веществу, выделенному из жира печени рыб) с наличием кетогруппы при углероде в седьмом положении и с максимумом поглощения при 250 *нм*. Это вещество было названо «кетоном 250». Последний в щелочной среде легко переходит в энольную форму кетона 250, которая в присутствии в среде ионов кальция избирательно присоединяет их, образуя энолят кальция с максимумом поглощения в эфире при 265 *нм*, а в этиловом спирте — при 262 *нм*. Кетон 250 обладает одной десятой антирахитической активности витамина $Д_3$ в опытах на

крысах и цыплятах (Prelot a. oth., 1958), а антирахитическая активность его энольной формы идентична таковой витамина $Д_3$ (Raoul a. oth., 1956). По мнению этих исследователей, кетон 250 является запасной формой витамина Д, которая при необходимости может превращаться в энольную форму.

Впоследствии было обнаружено (Даценко, 1969), что неомыляемая фракция кожи крыс, облученных ультрафиолетовым светом эритемной области спектра, содержит 5 до сих пор не известных веществ, образовавшихся в результате облучения. Эти вещества имели стероидную природу, но только два из них (с величинами R_f на хроматограмме, равными 0,85 и 0,75) обладали выраженной антирахитической активностью. Предварительные данные показали, что эти соединения не являются ни холекальциферолом, ни его активным метаболитом (25-оксихолекальциферол), ни кетоном 250 или его энолятом. Автор предположил, что обменно-активные формы витамина Д, ответственные за проявление его физиологического эффекта, могут быть различны, в зависимости от того, вводился в организм синтетический витамин Д или он образовался в процессе облучения животного ультрафиолетовым светом. Нужно отметить, что эти предположения требуют дальнейшей экспериментальной оценки, тем более, что химическая структура ни одного из названных соединений до сих пор еще не идентифицирована.

Таким образом, в изучении биосинтеза витамина Д достигнуты определенные успехи. Выяснена возможность синтеза витамина в животном организме. Значительная роль в данном процессе, по-видимому, принадлежит облучению кожи ультрафиолетовыми лучами. Реальным является синтез витамина ферментативным путем. Можно ожидать, что дальнейшая идентификация химической структуры соединений с Д-витаминной активностью, образующихся в организме, приведет к новым представлениям о биосинтезе и обмене витамина Д.

Всасывание витамина Д

Изучение всасывания витамина Д в желудочно-кишечном тракте представляет интерес с точки зрения разрешения некоторых вопросов, связанных с механизмом действия витамина Д и практическим его применением при некоторых патологиях. Важно выяснить, претерпевает ли молекула витамина какие-либо структурные изменения в процессе всасывания, установить условия, необходимые

для всасывания, механизм всасывания, зависимость всасывания (если она имеется) от обеспеченности организма данным витамином и дозы вводимого витамина.

В настоящее время общепринято мнение, что присутствие желчи является необходимым условием для кишечной абсорбции витамина Д. Жирорастворимость витамина и хорошо известная роль желчных кислот в усвоении жира, повидимому, имеют тесную корреляцию. Еще в 1933 г. было обращено внимание на важную роль желчи при всасывании витамина Д в кишечнике (Greaves, Schmidt, 1933). В дальнейшем это мнение нашло подтверждение в многочисленных исследованиях с применением различных доз и препаратов витамина Д и разных методик. Необходимость желчи для появления в крови витамина Д, введенного орально, показана определением Д-витаминной активности в крови с помощью биологического теста (Heymann, 1937). Более детальные исследования, проведенные с применением радиоактивного витамина Д, также выявили важную роль желчных кислот в процессе всасывания витамина Д в кишечнике экспериментальных животных (Schachter a. oth., 1964), а также у людей (Blomstrand, Forsgren, 1967). В наибольшей степени всасыванию витамина Д способствовала таурохолевая кислота (Schachter a. oth., 1964).

Известно, что витамин Д, введенный через рот, всасывается в тонком кишечнике. Однако относительно места преимущественной его абсорбции имеются некоторые разногласия. Первые исследования в этой области показали, что абсорбция витамина Д происходит в нижней трети тонкого кишечника (Kodicek, 1960). Это заключение было основано на экспериментах, в которых после орального введения радиоактивного витамина $Д_2$ определяли его содержание в ткани кишечника и в кишечном содержимом в разные промежутки времени. Оказалось, что через 10 *час* нижняя треть кишечника содержала больше витамина Д, а через 24 *час* уровень витамина стал выше в верхних сегментах кишечника. Это предположение Kodicek о преимущественной абсорбции витамина Д в ileum (подвздошный отдел тонкого кишечника) нашло подтверждение в последующих исследованиях с применением значительно меньшей дозы витамина (Norman, De Luca, 1963; Callow a. oth., 1966). В противоположность этим данным детальное исследование всасывания H^3- или C^{14}-витамина Д, вводимых в различные лигированные кишечные сегменты, показало, что основным местом абсорбции витамина Д является jejunum — тощая кишка (Schachter a. oth., 1964). Клинические наблюдения, проведенные на больных с небольшим остатком jejunum после кишечной

резекции, также обнаружили, что этот сегмент способен эффективно абсорбировать витамин Д (Thompson a. oth., 1965). На основании этих данных нельзя утверждать, что местом максимальной абсорбции витамина Д является jejunum, так как исследования проводились при обширной резекции кишечника, однако авторы убедительно доказали способность тощей кишки человека интенсивно абсорбировать витамин Д.

Таким образом, получены несколько различные данные о месте преимущественного всасывания витамина Д. По-видимому, следует согласиться с рассуждениями De Luca (1967), что эти различия в результатах могут быть обусловлены несоответствием условий проведенных экспериментов. Schachter и др. применяли раствор витамина Д в этаноле и пропилен-гликоле, в то время как Kodicek и др. в данных исследованиях пользовались масляным раствором витамина Д. Вероятно, характер растворителя играет определенную роль в усвоении витамина Д. В этом отношении интересны данные Thompson и сотр. (1966), которые при изучении метаболизма радиоактивного витамина Д у людей обнаружили нарушение абсорбции витамина у больных с ухудшением всасывания жира в кишечнике. Эти исследования имеют, несомненно, важное практическое значение, так как дают возможность правильного обоснованного подхода к выбору препаратов и путей их введения для профилактики и лечения рахита у больных с нарушением функции желудочно-кишечного тракта.

Результаты экспериментальных исследований всасывания радиоактивных препаратов витамина Д при появлении их в лимфе грудного протока ясно показали, что всасывание витамина происходит главным образом через лимфатические пути (Schachter a. oth., 1964). Основная доля введенного витамина обнаружена во фракции хиломикронов в виде свободного, биологически активного стерина. Авторы различают две стадии всасывания витамина Д: быструю — поглощение витамина слизистой кишечника и медленную — переход его в лимфу. Наиболее быстро и полно первая стадия протекает в средней части тощей кишки.

С получением радиоактивных препаратов витамина Д с высокой удельной активностью стало возможным проводить подобные исследования на людях. Результаты этих клинических поисков оказались идентичными данным, полученным в эксперименте на животных. Thompson и др. (1966) обнаружили, что через 2—3 *час* после орального введения меченого H^3-витамина $Д_3$ здоровым и больным людям с нарушением абсорбционной функции кишечника

45—100% (среднее 80%) радиоактивности представлено во фракции хиломикронов. Эти данные позволили авторам постулировать, что витамин $Д_3$ у людей, как и у экспериментальных животных (Schachter a. oth., 1964), в норме всасывается в основном через лимфатические каналы. К подобному заключению пришли Blomstrand и Forsgren (1967) на основании результатов изучения кишечной абсорбции 1,2-H^3-витамина $Д_3$ у людей с фистулой общего грудного протока. Они также обнаружили, что основная масса абсорбированного H^3-витамина $Д_3$ находится в свободной неэстерифицированной форме, что убедительно подтверждает ранее полученные экспериментальные данные (Schachter a. oth., 1964). По-видимому, в процессе кишечной абсорбции не происходят или происходят лишь незначительные изменения в химической структуре витамина Д (De Luca, 1967), хотя не исключена возможность, что определенную роль в абсорбции играет эстерификация молекулы витамина (Bell, Bryan, 1965).

При оральном применении витамин Д у экспериментальных животных (Callow a. oth., 1966) и у людей (Thompson a. oth., 1966) всасывается в кишечнике неполностью. У здоровых людей чистая абсорбция от принятого через рот 0,5—1 *мг* H^3-витамина $Д_3$ составляет 62,4—91,3% (среднее 78,6%) (Thompson a. oth., 1966). Остальная часть элиминируется фекалиями. Вначале было обнаружено, что обеспеченность организма витамином $Д_3$ не оказывает влияния на кишечную абсорбцию витамина Д (Kodicek, Ashby, 1960a,b). Однако в дальнейшем было установлено, что витамин Д-дефицитные животные могут абсорбировать или ассимилировать большее количество витамина Д по сравнению с животными, предварительно получавшими витамин Д (Blumberg a. oth., 1960; Norman, De Luca, 1963). Хотя имеются некоторые различия в полученных результатах, тем не менее многие исследователи едины во мнении, что нормальный организм эффективно абсорбирует основную часть орально введенного витамина Д.

Суммируя изложенное, можно отметить основные моменты в процессе кишечной абсорбции витамина Д.

1. Введенный через рот витамин Д абсорбируется главным образом в тонком кишечнике. Вопрос о месте преимущественного всасывания витамина Д в пределах тонкого кишечника является в настоящее время дискутабельным.

2. Абсорбция витамина Д происходит при непосредственном участии желчных кислот. Желчь играет основную роль во всасывании витамина Д в кишечнике.

3. По-видимому, кишечная абсорбция витамина Д не приводит к каким-либо существенным изменениям химической структуры молекулы витамина.

4. Абсорбция витамина Д осуществляется через лимфатические каналы. Из лимфы витамин Д в конечном счете попадает в кровеносную систему.

5. В норме всасывается значительная часть принятого витамина.

Транспорт витамина Д

Исследование транспорта витамина Д в крови является одним из интересных, успешно разрабатываемых в последние годы, вопросов в изучении метаболизма витамина Д. Успехи в этой области также связаны с применением радиоактивных препаратов витамина $Д_3$, усовершенствованием методов экстракции и анализа тканевых экстрактов.

Большинство литературных данных свидетельствует, что витамин Д и его метаболиты транспортируются в крови в виде комплекса с глобулинами и липопротеидами. Исследования с применением больших доз нерадиоактивного витамина, биологического тестирования для определения его в тканях и агарового гель-электрофореза для разделения белковых фракций показали, что Д-витаминная активность крови людей связана с α_1- и α_2- глобулиновыми фракциями. Подобные данные были получены и при использовании иммунофоретического метода для фракционирования плазменных белков у людей, получавших витамин $Д_3$ (Avioli a. oth., 1968). Несколько иные результаты были получены в эксперименте на крысах (Chalk, Kodicek, 1961). Последние обнаружили, что при инкубации радиоактивного витамина $Д_2$ в сыворотке крови крыс радиометка определяется в α_2-глобулиновой и альбуминовой фракциях.

Последующие исследования в этой области показали важную роль липопротеидов крови в транспорте витамина Д (Schachter a. oth., 1964; Chen, Lane, 1965; Rikkers, De Luca, 1967). В частности, было показано, что при инкубации сыворотки рахитичных крыс с радиоактивным витамином или непосредственно после инъецирования 1,2-H^3-витамина $Д_3$ или 22,23-H^3-витамина $Д_4$ в кровяное русло 47—56% радиоактивности связывалось липопротеидами, а остальная часть α_2-глобулинами крови (Rikkers, De Luca, 1967). Подобные результаты были получены в экспериментах in vitro при добавлении H^3-витамина $Д_3$ в концентрации 2 γ/100 *мл* к сыворотке крови собак (Chen, Lane, 1965). При этом доля

связываемого витамина с липопротеидами увеличивалась при повышении его концентрации в сыворотке крови.

Определенный интерес представляют данные, что после внутривенного введения меченого H^3-витамина $Д_3$ собакам некоторое количество радиоактивности (2—4,4%) локализовалось в эритроцитах (Chen, Lane, 1965). Возможно, определенную роль в транспорте витамина Д играют и форменные элементы крови.

Интересные сведения получены при сравнительном изучении связывания витамина Д белковыми фракциями крови через различные промежутки времени после введения в организм радиоактивных препаратов витамина Д (Rikkers, De Luca, 1967). Оказалось, что с течением времени после внутривенного инъецирования крысам меченых витаминов $Д_3$ и $Д_4$ происходит прогрессивный сдвиг радиоактивности от липопротеидов к фракции α_2-глобулинов. Связывание витамина α_2-глобулиновой фракцией скорее зависит от времени, прошедшего после введения препарата, чем от его дозы. На основании этих данных авторами высказано предположение, что именно α_2-глобулиновая фракция является основным транспортным белком для витамина Д и его метаболитов. По-видимому, после кишечной абсорбции через лимфатическую систему витамин Д в связанной с хиломикронами и липопротеинами форме поступает в печень, где в результате некоторых специфических воздействий связывается с α_2-глобулиновой фракцией и током крови транспортируется к тканям организма (De Luca, 1967).

Этими же исследователями в дальнейшем более подробно изучены вопросы связывания радиоактивных витаминов $Д_2$, $Д_3$ и $Д_4$ сывороточными белками крыс с применением метода полиакриламидного дискового электрофореза для фракционирования белка (Rikkers a. oth., 1969). Убедительно доказано, что с течением времени возрастает количество связанного с глобулинами витамина Д, а доля витамина в липопротеиновой фракции убывает (табл. 2). Глобулин в большей степени связывал витамин $Д_3$. Эти данные показывают, что глобулин, связывающий витамин $Д_3$, обладает намного большей комплементарностью к витамину $Д_3$, чем к витаминам $Д_2$ и $Д_4$.

Природа связи между молекулой витамина Д и сывороточными белками еще не ясна. Однако предварительные исследования показали довольно высокую устойчивость этой связи (Chen, Lane, 1965). Обработка трихлоруксусной кислотой, экстракция изооктаном, хлороформом и дихлорэтаном не разрушает связи между сывороточными белками и витамином Д. Эфир экстрагирует только 3,8%, а этилаце-

Таблица 2

Связывание витамина Д сывороточными белками (Rikkers a. oth., 1969)

Белок	Витамин	Время определения, *мин*		
		15	90	150
Гамма-глобулин	$Д_2$	42,8±1,3	54,2±1,1	66,3±16,4
	$Д_3$	81,7±4,4	90,0±1,1	92,1±4,8
	$Д_4$	44,0±0,8		56,9±2,6
Липопротеин (высокая плотность)	$Д_2$	20,0±5,5	17,3±2,0	13,2±2,5
	$Д_3$	5,2±1,1	1,5±0,7	1,3±0,6
	$Д_4$	14,6±1,5		8,4±2,0
Липопротеин (низкая плотность)	$Д_2$	15,1±3,6	10,9±1,0	8,6±2,2
	$Д_3$	4,9±0,6	1,6±0,8	2,7±2,0
	$Д_4$	15,4±0,4		5,0±1,0

Примечание. Данные выражают процент от радиоактивности сыворотки после введения крысам меченых препаратов витамина Д.

тат — 30,4% витамина Д, связанного с белками. Полное извлечение витамина достигнуто лишь после предварительного щелочного гидролиза белка.

Существенную роль в связывании витамина глобулином сыворотки, по-видимому, играет боковая цепь витамина. Малейшее изменение структуры боковой цепи отражается на способности белка связывать витамин Д. Гидроксильная группа в боковой цепи витамина повышает его сродство с белком (Rikkers a. oth., 1969). Исходя из этих соображений авторы предполагают, что возрастающая со временем способность глобулиновой фракции связывать витамин Д обусловлена образованием из молекулы витамина оксиформ, обнаруженных в последнее время (De Luca, 1969 и др.).

Комплекс витамина Д с белком представляет собой стабильное, не проходящее через ультрафильтры, соединение (Chalk, Kodicek, 1961; Rikkers, De Luca, 1967). Эта связь, вероятно, предохраняет молекулу витамина от распада и делает невозможным его экскрецию с мочой. В связи с этим можно предположить, что большее сродство витамина $Д_3$ с белком-переносчиком по сравнению с витаминами $Д_2$ и $Д_4$ (Rikkers a. oth., 1969) может иметь отношение к их биологической активности для различных видов животных. Витамины $Д_2$ и $Д_4$, обладая меньшим сродством с сывороточным глобулином, возможно, быстрее разрушаются и выводятся из организма. В этом отношении представляют интерес результаты сравнительного исследования скорости выве-

дения витаминов $Д_2$ и $Д_3$ из различных органов (Imrie a. oth., 1967). Оказалось, что радиоактивный витамин $Д_2$, введенный рахитичным цыплятам, намного быстрее, чем витамин $Д_3$, исчезает из крови, костной и мышечной тканей, что, очевидно, обусловлено большей скоростью деградации молекулы витамина $Д_2$ у цыплят.

Указанные данные, полученные при применении разных препаратов витамина Д у различных животных и людей, убедительно показывают, что витамин Д транспортируется в крови не в свободном состоянии, а в связанной с сывороточными белками форме. Основными транспортными белками для витамина Д, по-видимому, являются глобулины. Биологическое значение этих наблюдений пока еще не выяснено. Вероятно, связывание витамина Д сывороточными белками предохраняет его молекулу от метаболических деградаций и выполняет важную роль в транспорте витамина Д и его метаболитов к специфическим рецепторным молекулам органов-мишеней, что, в конечном счете, является необходимым условием для проявления нормального физиологического эффекта. В будущих исследованиях природа связи витамина с белком будет изучена более глубоко и более полно раскрыта биологическая сущность данного явления.

Выделение витамина Д и его метаболитов из организма

Первые же исследования, проведенные по изучению витамина Д, показали, что основным экскреторным путем витамина Д является печень (Heymann, 1936). Были проведены эксперименты с применением больших доз витамина и определением наличия в желчи Д-витаминной активности с помощью биологического теста. Несколько позднее обнаружили, что другим путем элиминации витамина Д является кишечная стенка (Heymann, 1937). Данные находки, несомненно, сыграли важную роль в развитии исследований метаболизма витамина Д. Однако отсутствие эффективных методов определения витамина Д в биологических средах и ряд других причин тормозили проведение точных исследований по выделению витамина Д. Кроме того, используемые методы не давали сведений о неактивных метаболитах витамина Д. Для установления природы выделяемого продукта были необходимы надежные методы разделения витамина Д, его метаболитов и их химической идентификации.

Дальнейшие исследования подтвердили предположение Heymann, и сейчас не вызывает сомнения, что основная часть витамина Д элиминируется с калом, хотя небольшое количество его обнаруживается в моче. В частности, Kodicek и Ashby (1960а) извлекли из кала и кишечного содержимого 59,4% от парентерально введенной дозы витамина Д. В экспериментах на крысах через 48 *час* после внутривенного введения меченых препаратов витамина Д до 30% радиометки обнаруживалось в желчи (Neville, De Luca, 1966). В то же время у больных с фистулой желчного протока, т. е. при исключении попадания желчи в кишечник, наблюдалось почти полное отсутствие витамина в кале и значительное его содержание в желчи (Avioli a. oth., 1967). Таким образом, важность роли желчи в экскреции витамина Д очевидна.

Другим не менее важным вопросом является определение скорости элиминации витамина Д. Оказалось, что до 17% от введенного внутривенно витамина Д в дозе 0,25 *мкг* (10 МЕ) появляется в кале крыс в пределах 48 *час*, в то время как после орального введения 500 МЕ H^3-витамина $Д_3$ в кале и кишечном содержимом обнаружено до 35,5% радиоактивности (De Luca, 1967).

По-видимому, следует отдать предпочтение результатам, полученным при парентеральном введении витамина, так как определенное количество принятого через рот витамина выделяется с калом, не всасываясь в кишечнике. Интересно сопоставить эти данные с результатами экспериментальных исследований Neville и De Luca (1966), в которых было обнаружено, что через 48 *час* после внутривенного инъецирования 10 МЕ H^3-витамина $Д_3$ крысам с фистулой желчного протока в извлекаемой желчи локализовалось до 10—20% радиоактивности. Содержание витамина в желчи и кале за равный промежуток времени после введения одинаковой дозы одному и тому же виду животного (крысам), как видно, коррелируется между собой. Это дает возможность предположить, что кишечная реабсорбция эндогенного витамина, поступающего с желчью, по-видимому, или не имеет места, или играет незначительную роль в метаболизме витамина Д.

Как экспериментальные работы, проведенные на крысах (Norman, De Luca, 1963), так и исследования на людях (Avioli a. oth., 1967) показали, что в отличие от желчи и кишечного содержимого в моче концентрируется лишь незначительное количество радиоактивности после введения меченых препаратов витамина Д. Однако некоторые отличия имеются в количественной характеристике результатов этих исследований. У крыс (Norman, De Luca, 1963) в пределах

24—48 *час* экскретируется с мочой только 1—2%, а у людей (Avioli a. oth., 1967) — до 2—4% радиоактивности от введенной дозы меченого витамина Д. Тем не менее эта разница небольшая, а абсолютное содержание витамина (или его метаболитов) в моче намного ниже, чем в желчи. Очевидно, выделение витамина Д с мочой не представляет собой основной путь его элиминации.

Имеются данные (Avioli a. oth., 1967), что время полувыведения меченого витамина $Д_3$ у здоровых людей составляет приблизительно 20—30 *час*. Однако несколько позднее появилось сообщение (Mawer a. oth., 1969), что витамин Д выделяется медленнее. Последние авторы установили существование более быстрой фазы экскреции витамина Д в начальный период после его введения в организм, за которым следовала фаза медленной элиминации биологически активного метаболита, образующегося из витамина $Д_3$, с периодом полувыведения 18—31 день. В последующем этими же исследователями (Lumb a. oth., 1971) было показано, что время полувыведения витамина $Д_3$ после применения его в различных количествах может достигать нескольких месяцев. В названных экспериментах об элиминации витамина Д судили в основном по исчезновению радиометки из плазмы крови после введения меченого витамина Д. Однако, исходя из данных Rosenstreich и сотр. (1971), основным местом «хранения» витамина Д является жировая ткань, а скорость исчезновения радиометки из данной ткани после введения крысам 4-C^{14}-витамина $Д_3$ наименьшая (по сравнению с другими исследованными тканями: кровь, печень, почки, мозг, кожа, мышцы, костная ткань и все отделы тонкого кишечника), следовательно, можно ожидать, что в действительности время полувыведения витамина Д значительно длиннее.

Результаты этих экспериментов подтверждаются более ранними исследованиями, в которых было показано, что в течение нескольких месяцев после введения однократной дозы витамина Д сохраняется его биологический эффект (Morgan, Shimotori, 1943; Quaterman a. oth., 1964), а время полуисчезновения Д-витаминной активности из плазмы крови людей после введения им высоких доз витамина Д составляет приблизительно 4 месяца (Warhany a. oth., 1942).

Одним из неполностью выясненных вопросов, как указывалось выше, является неодинаковая чувствительность различных видов животных к препаратам витамина Д. Естественно предположить наличие связи данного явления с особенностями метаболизма витамина Д. Некоторые объ-

яснения механизма данного различия появились в последние годы.

Известно, что витамин $Д_3$ обладает антирахитической активностью для цыплят приблизительно в 10 раз большей, чем витамин $Д_2$, в то время как оба витамина идентичны по отношению к крысам. Была выявлена определенная зависимость между биологической активностью этих витаминов и скоростью их элиминации из организма. После внутривенного введения 10 МЕ или C^{14}-витамина $Д_2$ или 1,2-H^3-витамина $Д_3$ рахитичным цыплятам было обнаружено, что многие органы быстро усваивают как C^{14}-, так и H_3-витамины (Imrie a. oth., 1967). Однако меченый C^{14}-препарат быстрее исчезает из крови (рис. 2)и в большем количестве, чем H^3-витамин $Д_3$, он появляется в желчи, кишечном содержимом и кале, т. е. быстрее выводится из организма.

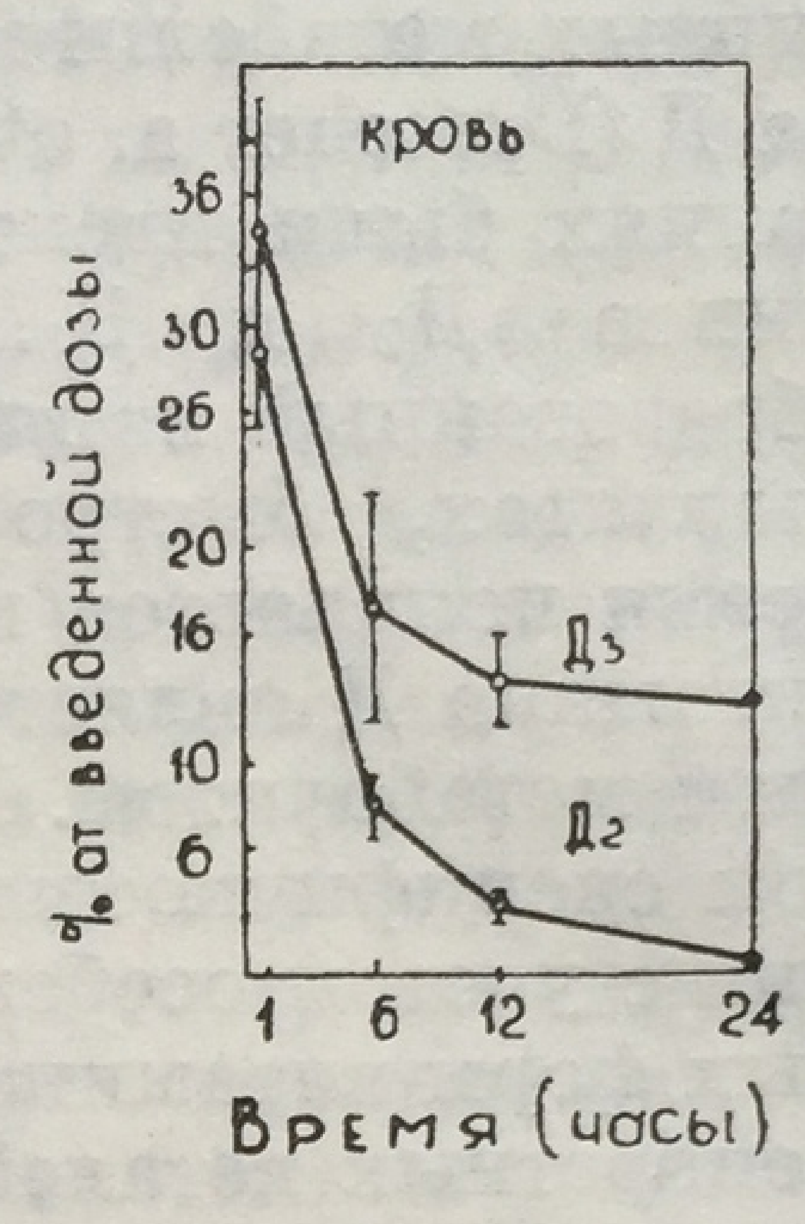


Рис. 2. Динамика исчезновения радиоактивности из крови рахитичных цыплят после внутривенного введения им 0,25 *мкг* 1,2-H^3-витамина $Д_3$ или 0,25 *мкг* C^{14}-витамина $Д_2$ (Imrie a. oth., 1967).

Подобно меньшей чувствительности цыплят к витамину $Д_2$, витамин $Д_4$ обладает меньшей биологической активностью для крыс, чем витамины $Д_2$ и $Д_3$. При сравнении обмена 1,2-H^3-витамина $Д_3$ и 22,23-H^3-витамина $Д_4$ у крыс было обнаружено, что многие органы вначале одинаково хорошо усваивают витамины $Д_3$ и $Д_4$, но затем H^3-витамин $Д_4$ быстро исчезает из крови, костной и мышечной тканей и с повышенной скоростью по сравнению с витамином $Д_3$ выделяется с калом через желчь (De Luca, 1967). Сниженная чувствительность крыс к витамину $Д_4$, таким образом, коррелирует с его быстрой элиминацией. Эти данные подтверждаются результатами исследований Neville, De Luca (1966), которые в эксперименте на крысах с фистулой желчного протока обнаружили, что до 30% радиометки от внутривенно инъецированного меченого витамина $Д_4$ в дозе 10 МЕ выделяется с желчью в течение 48 *час*, а в случае с подобной дозой 1,2-H^3-витамина $Д_3$ в желчи обнаруживается лишь 10—20% меченого препарата.

В этих экспериментах убедительно показан сам факт, что меньшая чувствительность к определенному препарату витамина Д связана с более быстрым его выведением из организма. Механизм такой избирательности пока еще не вы-

яснен полностью. Однако в последние годы в связи с более успешным изучением метаболитов витамина Д получены данные, вносящие некоторую ясность в понимание природы различной чувствительности животных к витаминам группы Д. Оказалось, что «различение» цыплятами витаминов $Д_2$ и $Д_3$ происходит на уровне разрушения биологически активных метаболитов, образующихся в организме из витамина Д (Drescher a. oth., 1969), которые в дальнейших исследованиях были идентифицированы как 25-оксиформы витаминов $Д_2$ и $Д_3$. Метаболит (25-оксиэргокальциферол), образованный из витамина $Д_2$, почти не активен в опыте на цыплятах, быстро разрушается и выводится. В последнее время появляется все больше сообщений, что 25-оксиформа витамина Д является не единственным биологически активным метаболитом. Выявлен ряд других, обладающих тканевой специфичностью, метаболитов. Дальнейшие исследования с учетом особенностей обмена этих биологически активных форм витамина Д, возможно, помогут выявлению более конкретных деталей в механизме «различения» животными препаратов витамина Д.

К сожалению, до сих пор еще не полностью идентифицированы метаболиты, обнаруженные в желчи, кале и моче. Однако имеются данные, что витамин Д выделяется не в свободном состоянии. При фракционировании желчи с помощью тонкослойной хроматографии после инъецирования крысам меченого C^{14}- витамина Д было показано, что радиоактивность связана с конъюгатами желчных кислот (Bell, Bryan, 1965). Обработка желчи β-глюкуронидазой приводит к высвобождению витамина Д (Avioli a. oth., 1967). По-видимому, выделение витамина Д с желчью происходит в виде глюкуронидов.

В моче основная часть витамина Д содержится в виде биологически неактивного водорастворимого компонента (Avioli a. oth., 1967). Даже после обработки β-глюкуронидазой и кислотного гидролиза мочи значительная часть мочевого компонента витамина Д остается в водорастворимом состоянии. У больных циррозом печени наблюдается снижение выведения глюкуронидов витамина $Д_3$ с мочой (Avioli a. oth., 1967). Очевидно, печень является местом образования этого соединения.

Таким образом, выделение витамина Д с калом представляет основной путь его элиминации. Небольшое количество витамина Д выделяется с мочой и, возможно, непосредственно самой кишечной стенкой. Витамин Д экскретируется главным образом в виде конъюгатов желчных кислот. Скорость выделения витамина Д сравнительно невысокая.

Тканевое распределение витамина Д

Для исследования природы взаимодействия витамина Д на клеточном, субклеточном и молекулярном уровне прежде всего необходимо знать его органную и тканевую локализацию. Наиболее ранние эксперименты в этой области провел Heymann (1937), который после введения кроликам больших количеств витамина Д (200 000 МЕ) с помощью биологического метода определял Д-витаминную активность в различных тканях и впервые обратил внимание на то, что витамин Д распределяется по многим органам и тканям. Однако он не сделал попыток количественно определить содержание витамина в тканях, по которому можно было бы судить о проценте усвояемости витамина различными тканями по отношению к введенной дозе или о какой-либо преимущественной тканевой локализации витамина. Это вполне понятно, поскольку в то время еще не было достаточно чувствительных методов определения витамина Д, а метод биологического определения был довольно громоздким и занимал много времени.

Дальнейшие исследования в этой области носили в основном количественный характер и были направлены на определение способности тканей аккумулировать введенный витамин Д. После однократного введения массивных доз различных форм витамина Д у собак его антирахитическая активность обнаруживается в печени, почках, легких, селезенке, кишечнике, мозгу, костной ткани, мышцах, сердце, коже и волосах (Morgan, Schimotori, 1943). Подобное распределение витамина наблюдается и у крыс после введения им больших количеств эргокальциферола (Cruickshank a. oth., 1953; 1954; Хвуль, 1960). В зависимости от дозы и пути введения в тканях обнаруживается от 10% (Morgan, Schimotori, 1943) до 25% (Cruickshank a. oth., 1953, 1954) принятого витамина Д. Депонирование витамина Д было одинаково хорошо выражено как при однократном, так и при длительном его введении (Хвуль, 1960).

Имеются данные, что аккумуляция витамина Д тканями зависит от обеспеченности им организма. Рахитичные животные усваивают бо́льшее количество витамина от введенной дозы, чем животные, предварительно получавшие витамин Д (Blumberg a. oth., 1960; Norman, De Luca, 1963). Позднее было обнаружено, что кости рахитичных крыс поглощают больше витамина Д, чем кости крыс с нормальным содержанием витамина. По-видимому, это обусловлено или снижением скорости абсорбции, или повышенным выделением витамина при достаточной обеспеченности им, или

повышенной способностью тканей рахитичных животных к аккумуляции витамина Д, что, возможно, является результатом приспособительной реакции организма, поскольку для него нежелательны как недостаток, так и избыток данного витамина.

Таким образом, первоначальные исследования по тканевому распределению показали, что витамин Д локализуется почти во всех органах. Предпочтительной локализации витамина в каком-либо органе обнаружено не было. Подобные данные в этих работах, по-видимому, и не могли быть получены, так как специфическое связывание витамина, вероятно, можно наблюдать при введении его в организм в физиологических дозах.

В связи с отсутствием достаточно эффективных физических или химических методов определения малых количеств витамина было почти невозможно изучить метаболизм витамина Д, применяемого в физиологических дозах. Биологическое определение витамина Д связано с необходимостью введения его в довольно больших количествах. Естественно, этот метод оказался также непригодным для детальных исследований субклеточного распределения витамина, не говоря уже о том, что он не дает никаких сведений о биологически неактивных метаболитах витамина Д. Несомненно, что успехи, достигнутые к настоящему времени в области изучения обмена витамина Д, в значительной степени обусловлены приготовлением его радиоактивных препаратов.

Необходимо отметить, что первоначально синтезированные радиоактивные препараты витамина Д (Havinga, Botts, 1954; Kodicek, 1956; Blumberg a. oth., 1960; Schaltegger, 1960 и др.) обладали слишком низкой удельной активностью, что затрудняло их определение в тканях после предварительного введения витамина в физиологических дозах. Поэтому они вводились в довольно значительных количествах и результаты исследований с применением этих препаратов лишь подтвердили данные, полученные с использованием нерадиоактивного витамина Д, и не внесли существенно нового в уже известные представления о тканевом распределении витамина Д.

Только с получением меченого витамина Д с высокой удельной активностью стало возможным применение витамина в небольших количествах для последующего определения его в тканях, что дало возможность подробно исследовать тканевую локализацию физиологических доз витамина.

После введения меченых препаратов витаминов $Д_2$ и $Д_3$ в дозе 500 МЕ как у крыс (Norman, De Luca, 1963), так и у цыплят (Haussler, Norman, 1967) значительное количество радиоактивности обнаруживается во многих тканях уже в пределах одного часа. Однако независимо от пути введения (энтерально или парентерально) большая доля радиоактивности наиболее быстро аккумулировалась печенью. Затем следовал период спада концентрации метки в печени с одновременным относительным повышением количества меченого препарата в крови. Эти данные подтверждаются также результатами наших исследований (Тажибаев, 1972). В частности, мы обнаружили, что через 4 *час* после введения интактным крысам 600 МЕ 1,2-H^3-витамина $Д_3$ наибольшая концентрация радиометки локализуется уже не в печени, а в крови. При этом способность тканей ассоциировать меченый витамин $Д_3$ уменьшалась в последовательности: кровь — селезенка — печень — слизистая тонкого кишечника — почки — легкие — кожа — тимус — мышечная ткань.

Исчезновение H^3 из плазмы после внутривенного инъецирования 10 МЕ 1,2-H^3-витамина $Д_3$ авитаминозным крысам соответствовало кривой, характеризующейся первоначальным резким падением с последующим небольшим подъемом с максимумом приблизительно через 3 *час*, а затем медленным снижением (Ponchon, De Luca, 1969). Подъем радиоактивности в плазме совпадал с резким снижением ее в печени и появлением метаболитов витамина Д в плазме.

Подобные данные получены в дальнейшем многими исследователями в экспериментах с применением 10 МЕ или меньших количеств 1,2-H^3-витамина $Д_3$ (Neville, De Luca, 1966), 22,23-H^3-витамина $Д_4$ (De Luca, 1967) и C^{14}-витамина $Д_2$ (Imrie a. oth., 1967). Максимальную концентрацию радиоактивности в печени находили при этом уже в пределах нескольких минут после введения меченого витамина с последующим быстрым уменьшением количества метки через 24 *час* и очень медленным снижением после этого времени.

Avioli с сотр. (1967) путем определения H^3-витамина $Д_3$ в сыворотке после внутривенного введения его здоровым людям также обнаружили двухфазную кривую пребывания витамина Д в крови.

Результаты этих исследований дали возможность полагать (De Luca, 1967 и др.), что витамин Д вначале аккумулируется печенью, которая принимает участие в метаболических превращениях витамина, а затем уже током крови разносится к другим тканям. С другой стороны, эти исследования способствовали направленному изучению метабо-

лизма витамина Д. Так, в последующем было установлено, что молекула витамина Д преобразуется в печени в 25-окси-форму, являющуюся биологически активным метаболитом. Кроме того, в печени витамин Д, по-видимому, связывается с транспортными белками и в виде подобного комплекса попадает снова в кровяное русло.

Изучение метаболизма радиоактивного витамина Д методом авторадиографии показало, что метка локализуется в купферовых клетках печени, эпителиальных клетках кишечных ворсинок (Kodicek, 1960), проксимальных канальцах почек (Kodicek a. oth., 1961) и сарколеммах мышц (Kodicek, 1963).

Однако метод авторадиографии требует введения значительного количества радиоактивного препарата и эти данные были получены при применении витамина в дозах 40000—80000 МЕ на крысу. При введении же физиологических доз витамин Д во многих органах локализуется в относительно небольших количествах (Neville, De Luca, 1966).

Заслуживает внимания обнаружение аккумуляции витамина в хондроцитах эпифизов костей (Kodicek, Thompson, 1965), так как последние являются основным местом отложения солей кальция в ответ на введение витамина Д.

Нужно отметить, что некоторые исследователи (Raoul, Gounelle, 1958 и др.) получили данные о нахождении значительной доли введенного витамина Д в надпочечниках, на основании чего авторами было выдвинуто предположение об участии этих эндокринных желез в превращении витамина в метаболически активную форму. Однако в последующем в экспериментах с применением радиоактивных препаратов витамина Д эти результаты не подтвердились (Norman, De Luca, 1963 и др.). Радиоактивность в надпочечниках после введения меченого витамина Д оказалась незначительной. Кроме того, адреналэктомия не снимает физиологическое действие витамина Д, и этот факт служит еще одним доказательством, что надпочечники не играют важной роли в образовании метаболически активной формы витамина Д (Gounelle, Raoul, 1964; Czarnowska-Misztal a. oth., 1966).

Весьма интересны наблюдения Лукьяновой и Вендт (1965), которые обнаружили, что витамин Д депонируется в плаценте и передается через нее ребенку. Содержание витамина Д в плаценте при нормальной обеспеченности им организма беременной женщины довольно велико и составляет приблизительно 2053 МЕ на 50 *г* плаценты. Аккумуляция витамина в плаценте зависит от обеспеченности им организма матери. При симптомах, характерных для Д-гипо-

витаминоза, наблюдается очень низкое содержание витамина Д в плаценте, а при насыщении беременных женщин препаратами витамина Д (400000—600000 МЕ за 8—10 дней) содержание последнего в плаценте резко увеличивается и достигает 15000—20000 МЕ на 50 *г* плаценты.

Недавно Haddad и сотр. (1971) в эксперименте на крысах показали возможность плацентарного переноса не только витамина $Д_3$, но и его обменно-активной формы — 25-оксихолекальциферола. Плацентарный перенос определяли по распределению радиометки после введения животным меченых препаратов витамина $Д_3$ и 25-оксихолекальциферола. Кроме того, авторы обнаружили полную идентичность хроматографических профилей жирорастворимых экстрактивных веществ из материнской плазмы и цельного плода.

Таким образом, убедительно показан сам факт плацентарного переноса витамина Д от матери к плоду. Выявлено также, что значительная часть принятого витамина Д у беременных аккумулируется в плаценте. По-видимому, это вызвано потребностью плода в витамине Д для обеспечения нормальной минерализации, роста и развития костной ткани. Очевидно, эти данные необходимо учитывать для профилактики как недостаточности, так и передозировки витамина Д у беременных.

Заслуживает внимания и вопрос о «хранении» витамина Д в организме. При этом обычно изучаются места преимущественного депонирования витамина Д и формы его «хранения». В связи с этим представляет интерес, что кровь содержит значительное количество введенного витамина Д. Так, даже через несколько месяцев после введения высоких доз витамина Д кровь обладает выраженной Д-витаминной активностью (Warkany a. oth., 1942; Quaterman a. oth., 1964). Авторы высказали предположение, что кровь по сравнению с другими компонентами организма имеет большее значение в «хранении» витамина Д.

По данным Deuel (1951), более вероятным местом «хранения» витамина Д у млекопитающих является печень. Последнее предположение согласуется с наблюдениями о наличии высокой концентрации Д-витаминной активности в печени некоторых видов рыб.

Однако недавние исследования, проведенные на крысах (Rosenstreich a. oth., 1971), свидетельствуют о важной роли жировой ткани в «хранении» витамина Д. Авторы в течение двух недель ежедневно вводили крысам с недостаточностью витамина Д различные дозы 4-C^{14}-холекальциферола (0,5,

5,0, 125 *мкг*), а затем в течение 3 месяцев определяли радиоактивность и содержание витамина Д в разных органах и тканях. При этом было обнаружено, что: а) значительная концентрация радиоактивности при введении меченого витамина Д локализуется в жировой ткани; б) скорость выведения радиометки из жировой ткани значительно меньше по сравнению с другими тканями; в) к концу опыта наибольшая концентрация радиометки обнаруживалась в жировой ткани; г) в жировой ткани значительная доля (около 50%) радиоактивности приходилась на неизмененный витамин $Д_3$, в то время как радиоактивность плазмы была обусловлена главным образом полярными метаболитами витамина Д. Исходя из этих данных, было сделано заключение, что основным местом «хранения» неизмененной формы витамина Д является жировая ткань.

Естественно предполагать, что витамин Д, являясь одним из важных регуляторов гомеостаза кальция и фосфора, локализуется и оказывает свое действие в органах с высоким минеральным обменом, а именно в кишечнике, костной ткани и почках. Наиболее интересные в этом отношении сведения получены при изучении локализации физиологических доз витамина Д в тканях рахитичных животных. Тканевое распределение 10,7 МЕ 1,2-H^3-витамина $Д_3$ через 4 *час* после его введения рахитичным крысам представлено в таблице 3 (Neville, De Luca, 1966).

Оценка аккумуляции витамина различными органами в процентном отношении от введенной дозы показывает, что значительная доля витамина локализуется в печени, скелете, крови и мышечной ткани. Однако наиболее правильное определение специфичности локализации витамина Д в тканях может быть получено при вычислении количества аккумулированного витамина на число клеток (Neville, De Luca, 1966; De Luca, 1967; Imrie a. oth., 1967). Авторы предположили, что витамин Д или его метаболиты скорее откладываются в костных клетках, где он оказывает свое действие, чем во внеклеточной фракции кости. Учитывалось также различие локализации витамина в гладкой мускулатуре и слизистой оболочке тонкого кишечника. При этом обнаружено, что наибольшая концентрация витамина Д аккумулируется клетками костной ткани и слизистой тонкого кишечника. Данная находка, конечно, представляет большой интерес, так как витамин Д оказывает свое преимущественное действие именно в этих тканях.

Подобные результаты преимущественной локализации витамина Д в костной ткани и слизистой тонкого кишечника обнаружили и другие исследователи (Haussler, Norman,

Таблица 3

Динамика распределения радиометки у крыс после внутривенного введения 1,2-H^3-витамина $Д_3$[а]
(Neville, De Luca, 1966)

Орган и ткань	Радиоактивность, % от введенной дозы	Относительная[б] радиоактивность
	через 4 *час* после введения дозы	
Селезенка	1,04±0,17	3620±292
Легкие	1,72±0,49	2739±732
Сердце	0,71±0,20	1409±353
Кишечник (толстый)	0,35±0,03	813±80
Кишечник (тонкий)	1,73±0,07	2305±502
Слизистая кишечника[в]		7113
Почки	2,35±0,19	2201±441
Кровь[г]	12,92±19,6	2272±413
Мышцы[д]	8,61±2,75	244±70
Печень	28,59±2,04	5958±893
Кости[е]	26,78±3,8	501±73
Костные клетки[ж]		12525
Содержимое тонкого кишечника	5,62±1,05	2831±545
Содержимое толстого кишечника + фекалий	3,17±0,38	1010±277
Тотальная радиоактивность, %	93,6	

Примечание. [а]Крысы содержались на рахитогенной диете в течение 3 недель; 1,2-H^3-витамин $Д_3$ вводился внутривенно в дозе 10,7 МЕ. [б] Относительная радиоактивность выражена в *имп/мин*/100 *мг* сухого веса. [в]Вычисления производили исходя из того, что в тонком кишечнике 30% сухого веса приходится на долю слизистой оболочки, а 70% — на долю мышечной и соединительной тканей и что радиоактивность гладких мышц равна таковой скелетных мышц. [г]Кровь составляет 6%, [д]мышцы — 30%, [е]скелет — 15% веса тела. [ж]Предполагалось, что 4% сухого веса костной ткани приходится на долю костных клеток, и витамин Д локализуется в костных клетках.

1967). Через 24 *час* после внутривенного инъецирования 5 МЕ H^3-витамина $Д_3$ скелет аккумулировал 0,40, тонкий кишечник — 0,12, печень — 0,16 и почки — 0,06 МЕ витамина. При введении физиологической дозы (15 МЕ) в слизистой тонкого кишечника локализовалось 0,4 МЕ витамина $Д_3$. Приняв во внимание, что влажный вес клеток слизистой тонкого кишечника равен 3—4 *г*, авторы вычислили, что на 1 *г* клеток слизистой приходится $4{,}8—6{,}5 \times 10^{-12}$М витамина $Д_3$. Если предполагать, что 0,75 клетки приходит-

ся на 1 *нг* влажного веса слизистой кишечника, то количество витамина, аккумулированного одной клеткой, составляет приблизительно 3800—5100 молекул. Это означает, что столько же рецепторных молекул для витамина Д содержит одна клетка слизистой тонкого кишечника цыплят, хотя не исключена возможность неспецифического связывания определенной части даже этого количества витамина (Norman, 1968).

Суммируя изложенные данные, можно сказать, что витамин Д в течение короткого промежутка времени аккумулируется многими тканями, в том числе тканями, в которых он оказывает свой физиологический эффект (слизистая тонкого кишечника и кости). Это время значительно короче латентного периода в действии витамина Д. Значит, витамин Д или, возможно, его биологически активные метаболиты достигают свои органы-мишени еще задолго до наблюдаемого биохимического или физиологического ответа, и, очевидно, латентный период в действии витамина не обусловлен задержкой усвоения его тканями. Однако результаты этих исследований показали важную роль печени в метаболизме витамина Д. Анализ характера пребывания витамина Д в печени и крови дал возможность предположить, что печень, по-видимому, является местом образования биологически активных метаболитов витамина, откуда они после высвобождения в кровь разносятся к тканям. Несомненно, эти исследования сыграли определенную роль в изучении метаболитов витамина Д. В частности, в последующем были идентифицированы и выделены 25-оксиформы витаминов группы Д, обладающие значительной биологической активностью и образующиеся в печени ферментативным путем. Однако хотя печень аккумулирует значительное количество витамина Д непосредственно после его введения в организм, в последующем происходит быстрое высвобождение витамина из данного органа. К моменту проявления физиологического действия витамина уже не наблюдается какой-либо предпочтительной локализации его в печени.

Витамин Д, введенный в организм как рахитичных, так и интактных животных в дозах, превышающих физиологическую потребность в нем, одинаково хорошо распределяется во многих тканях. Предпочтительной локализации витамина в органах, где он оказывает свое действие, при этом не выявлено, что, по-видимому, является отражением чрезвычайно малой потребности этих органов в витамине Д и связывании его с нейтральными тканями после насыщения витамином органов-мишеней. Физиологические дозы витамина избирательно аккумулируются в клетках слизистой

кишечника и костной ткани рахитичных животных, оказывают на них свое преимущественное действие, и эти ткани, очевидно, являются мишенями для витамина Д. Связывание излишних количеств витамина при употреблении его в массивных дозах органами, не являющимися мишенями для витамина Д, по-видимому, носит неспецифический характер.

Субклеточное распределение витамина Д
Циторецепция витамина Д

Выяснение субклеточного распределения витамина Д и его метаболитов создает предпосылки для более полного понимания его механизма действия на биохимическом и молекулярном уровне. Исследования в этом направлении предусматривают решение ряда важных вопросов. Во-первых, представляет несомненный интерес, проникает ли молекула витамина через клеточные и субклеточные мембраны. Если да, то в каких субклеточных органеллах возможно его селективное накопление и имеет ли данный процесс тканевую специфичность. Во-вторых, важно выяснить, как скоро введенный рахитичным животным витамин аккумулируется органеллами, и имеет ли данный процесс отношение к латентному периоду в действии витамина Д. В-третьих, локализуется ли в субклеточных фракциях сам неизмененный витамин Д или его метаболическая форма. Разрешение всех этих вопросов имеет особую значимость, так как многие исследователи в настоящее время предполагают, что физиологическое действие витамина Д включает инициацию транскрипции генетической информации в слизистой тонкого кишечника.

Нужно отметить, что исследования субклеточного распределения витамина Д проводились в основном с применением его радиоактивных препаратов и тесно связаны как с получением меченого витамина Д с высокой удельной активностью, так и с развитием методов фракционирования клетки и субклеточных органелл. В связи с очень незначительной потребностью в витамине Д особо возрастает роль этих факторов в получении надежных результатов. Нерадиоактивные методы определения в субклеточных фракциях, даже самые чувствительные, требуют применения витамина Д в дозах, превышающих физиологическую потребность в нем.

Применив чувствительный метод газо-жидкостной хроматографии для определения витамина Д, Nair и Bucana (1966) изучили распределение 8000—80000 МЕ витаминов

$Д_2$ и $Д_3$ в субклеточных фракциях печени, полученных путем дифференциального ультрацентрифугирования. Оказалось, что меньшие дозы витамина распределяются в основном в супернатантной фракции, а более высокие дозы витамина относительно однородно локализуются во всех субклеточных фракциях. Несколько иные результаты получил Kodicek (1963), который обнаружил, что через 24 *час* после введения 1 *мг* (40000 МЕ) меченого C^{14}-витамина $Д_2$ наибольшая концентрация радиоактивности наблюдается в супернатантной фракции печени. Возможно, различия в результатах обусловлены тем, что первые проводили определения через 15 *мин* или 1 *час* после введения витамина. Хотя эти исследования проводились с применением нефизиологических доз витамина Д и, по-видимому, не имеют принципиального значения для суждения о специфичности связывания витамина в определенных клеточных органеллах, тем не менее они убедительно показывают, что в течение незначительного промежутка времени молекула витамина (возможно, его метаболита) проникает через клеточную оболочку и обнаруживается в ядерной, митохондриальной, микросомальной и цитоплазматической фракциях клеток печени. В дальнейшем результаты многочисленных исследований (Norman, De Luca, 1964a, b; Haussler, Norman, 1967; Moriuchi a. oth., 1967; Stohs, De Luca, 1967; Wilson a. oth., 1967; De Luca, 1969b,c; Norman a. oth., 1969; Chen a. oth., 1970 и др.) с применением различных доз и препаратов витамина Д убедительно показали, что данный витамин и его метаболиты в течение короткого промежутка времени после введения в организм аккумулируются ядерной, митохондриальной, микросомальной и супернатантной фракциями клеток печени, почек, слизистой оболочки тонкого кишечника и костной тканью.

При сравнительном изучении субклеточного распределения 15, 50 и 500 МЕ H^3-витамина $Д_3$ в печени, почках, слизистой оболочке тонкого кишечника в течение различного промежутка времени было обнаружено, что физиологические дозы селективно аккумулируются ядрами клеток лишь слизистой тонкого кишечника (Haussler, Norman, 1967). В ядерной, митохондриальной и микросомальной фракциях печени и почек как физиологические, так и нефизиологические дозы витамина Д локализуются сравнительно однородно. Применение витамина в нефизиологических дозах приводит к уменьшению процента радиоактивности в ядерной фракции слизистой тонкого кишечника.

Таблица 4

Субклеточное распределение 1,2-H^3-витамина $Д_3$ в слизистой тонкого кишечника рахитичных крыс и цыплят* (Stohs, De Luca, 1967)

Фракция	Препарат	Процент от тотальной радиоактивности гомогената ($M \pm m$)
	Крысы	
Ядра	10 МЕ H^3-вит. $Д_3$	$57{,}6 \pm 3{,}4$
Митохондрии	10 МЕ H^3-вит. $Д_3$	$6{,}7 \pm 0{,}4$
Микросомы	10 МЕ H^3-вит. $Д_3$	$10{,}3 \pm 1{,}2$
Рибосомы	10 МЕ H^3-вит. $Д_3$	$0{,}6 \pm 0{,}2$
Супернатант	10 МЕ H^3-вит. $Д_3$	$22{,}8 \pm 6{,}2$
	Цыплята	
Ядра	10 МЕ H^3-вит. $Д_3$	$52{,}1 \pm 8{,}4$
Ядра	50000 МЕ H^3-вит. $Д_3$	$7{,}5 \pm 0{,}3$
Ядра	125 *мкг* вит. $Д_3$** + 10 МЕ H^3-вит. $Д_3$	$18{,}0 \pm 1{,}6$
Ядра	125 *мкг* 7-дегидрохолестерин** + 10 МЕ H^3-вит. $Д_3$	$46{,}6 \pm 4{,}9$
Ядра	125 *мкг* дигидротахистерин$_2$** + 10 МЕ H^3-вит. $Д_3$	$17{,}8 \pm 7{,}9$

Примечание. * 1,2-H^3-витамин $Д_3$ вводили внутривенно: крысам за 8 *час*, цыплятам за 12 *час* до забоя. ** Нерадиоактивный витамин $Д_3$, 7-дегидрохолестерин и дигидротахистерин$_2$ вводили цыплятам дважды по 62 *мкг* за 36 и 24 *час* до забоя.

Подобная селективность в аккумуляции физиологических доз витамина Д ядерной фракцией слизистой тонкого кишечника убедительно показана и в других исследованиях (Stohs, De Luca, 1967; De Luca, 1969a, b, c). Так, было выявлено, что после введения 10 МЕ 1,2-H^3-витамина $Д_3$ рахитичным крысам и цыплятам около 60% радиометки гомогената слизистой тонкого кишечника локализуется в ядерной фракции (табл. 4). Увеличение дозы 1,2-H^3-витамина $Д_3$ так же, как предварительное введение нерадиоактивного витамина $Д_3$ или его аналога (дигидротахистерин$_2$), приводило к уменьшению процентного содержания радиометки в ядрах слизистой кишечника. Предварительное применение 7-дегидрохолестерина, не обладающего Д-витаминной активностью, не оказало заметного влияния на включение метки в ядерную фракцию. Эти данные могут свидетельствовать

Таблица 5

Субклеточное распределение 1,2-H^3-витамина $Д_3$, введенного интактным крысам внутривенно в дозе 600 МЕ за 4 *час* до забоя

Фракция	Процент от тотальной радиоактивности гомогената				
	Слизистая тонкого кишечника	Печень	Почка	Тимус	Селезенка
Ядра	33,1±2,4	16,5±1,3	15,2±1,1	7,6±2,0	5,2±0,7
ДНП	5,2±0,3	Следы	Следы	0	0
ДНК	0	0	0	0	0
Митохондрии	12,8±0,6	9,5±1,2	7,7±1,7	8,9±0,1	11,5±0,4
Микросомы	11,5±1,4	10,7±0,8	7,9±1,3	7,6±0,5	13,4±1,6
Супернатант	37,2±3,5	61,2±7,4	66,6±4,7	75,8±9,1	69,6±3,2

о наличии специфических рецепторных локусов для витамина Д в ядрах слизистой тонкого кишечника, которые способны аккумулировать лишь определенное число молекул витамина Д и насыщаются им при применении последнего в более высоких дозах.

Нами было изучено субклеточное распределение 1,2-H^3-витамина $Д_3$ в различных тканях у интактных крыс. Меченый витамин вводили в дозе 600 МЕ за 4 *час* до забоя. Анализ распределения радиометки в субклеточных фракциях слизистой тонкого кишечника, печени, почки, тимуса и селезенки показывает (табл. 5), что значительное количество меченого витамина Д обнаруживается в ядерной фракции только слизистой тонкого кишечника. Во всех других исследованных органах основная часть витамина Д локализуется в супернатанте. Введение меченого витамина $Д_3$ в дозе, превышающей физиологическую потребность в нем, интактным животным, обеспеченным витамином Д, привело к уменьшению процентного содержания радиометки в ядерной фракции слизистой тонкого кишечника по сравнению с данными, полученными в опытах на рахитичных животных. Следовательно, с увеличением дозы витамина Д или при введении последнего животным на фоне нормального Д-витаминного статуса происходит нивелирование картины специфической аккумуляции витамина Д.

Локализация значительного количества меченого витамина Д в цитоплазматической фракции печени, почки, тимуса и селезенки обусловлена, по-видимому, неспецифическим связыванием «излишних» количеств витамина Д, по-

скольку названные органы не являются мишенями его действия. Однако субклеточное распределение витамина Д в названных органах не является идентичным: в ядерной фракции печени и почки аккумулируется значительно большее количество меченого препарата, чем в ядрах тимуса и селезенки. Возможно, эти различия связаны с тем, что печень и почки, как выяснилось недавно, являются местом трансформации молекулы витамина Д в обменно-активные формы.

Интересен вопрос о локализации витамина Д в пределах ядер слизистой кишечника. В связи с предполагаемым действием витамина Д на уровне генома важно, естественно, выяснить, проникает ли он через ядерную мембрану или локализуется в последней. Разрешение этого вопроса тесно связано с развитием надежных методов субфракционирования ядер и методов контроля чистоты полученных фракций.

Исследования, проведенные Stohs и De Luca (1967) с применением 1,2-H^3-витамина $Д_3$ с высокой удельной активностью (26000—160000 *имп/мин*/МЕ) показали, что основная часть витамина Д, локализованного в ядерной фракции слизистой тонкого кишечника крыс и цыплят, связана с ядерной мембраной. Это заключение было сделано авторами на основании того, что ядерная фракция, не очищенная от наружной ядерной оболочки, содержит основную часть радиоактивности гомогената слизистой кишечника, в то время как ядра, подверженные очистке от ядерных мембран, лишаются значительного количества радиоактивности. В частности, неочищенная фракция ядер содержала около 60%, а ядра, очищенные от мембран в процессе изолирования их в 1% растворе лимонной кислоты (Mirsky, Pollister, 1946) или в 2,3 М растворе сахарозы с 1% тритоном Х-100 (Blobel, Potter, 1966),— соответственно лишь 12 и 22% радиометки (табл. 6).

При обработке ядер лимонной кислотой (Gurr a. oth., 1963) и тритоном Х-100 (Blobel, Potter, 1966), как известно, удаляется наружная ядерная мембрана. Ядра, изолированные в 2,3 М растворе сахарозы без добавления лимонной кислоты или тритона Х-100, сохраняют наружную мембрану и имеют значительную радиоактивность. Таким образом, авторы пришли к заключению, что основным местом локализации витамина Д в слизистой тонкого кишечника являются ядерные мембраны. Отмечено также, что ядерная радиоактивность в слизистой тонкого кишечника обусловлена главным образом неидентифицированным в то время полярным метаболитом (или метаболитами) витамина Д.

Однако несколько позднее при введении рахитичным цыплятам 10—100 МЕ 1,2-H^3-витамина $Д_3$ или 4-C^{14}-витамина $Д_3$ было установлено, что основная часть радиометки в слизистой тонкого кишечника локализуется не в ядерных

Таблица 6

Аккумуляция H^3 в ядрах слизистой тонкого кишечника крыс после введения им 10 МЕ H^3-витамина Д
(Stohs, De Luca, 1967)

Орган	Среда выделения ядер	Процент от тотального H^3 ткани
Кишечник крыс	1% лимонная кислота	12,2±3,8
	2,2 М сахароза	46,4±11,3
Печень крыс	2,3 М сахароза	2,52±0,57
ДНП кишечника крыс	ЭДТА + NaCl	9,6±0,7
Кишечник цыплят	1% лимонная кислота	14,8±6,9
	2,3 М сахароза	52,1±8,4
	2,2 М сахароза + 1% лимонная кислота	15,1±6,7
	2,2 М сахароза и 3-кратная обработка 1% тритоном Х-100	22,0±7,4

Примечание. Все животные получали 10 МЕ 1,2-H^3-витамина $Д_3$ или 22, 23-H^3-витамина $Д_4$. Крысы забивались через 8 *час*, а цыплята — через 12 *час* после введения витамина.

мембранах, а в хроматиновой фракции ядер (Haussler a. oth., 1968). После экстракции и хроматографии связанного с хроматином радиоактивного вещества оказалось, что 87% его присутствует в виде полярного метаболита витамина Д, обозначенного как IVB-метаболит. Данный метаболит не был идентифицирован, однако обладал биологической активностью, эквивалентной таковой витамина $Д_3$. Кроме того, связывание метаболита хроматиновой фракцией ядер клеток слизистой тонкого кишечника значительно снижалось при предварительном введении рахитичным цыплятам нерадиоактивного витамина $Д_3$ или его аналогов, таких как витамин $Д_2$ или дигидротахистерины. IVB-метаболит не обнаруживался в хроматиновой фракции печени, т. е. в органе, не являющемся мишенью для витамина Д.

На основании этих данных было высказано предположение, что избирательная аккумуляция физиологических доз витамина Д осуществляется не ядерными мембранами, а хроматиновой фракцией клеток слизистой тонкого кишечни-

ка, где, по-видимому, содержатся специфические рецепторные молекулы не для самого витамина Д, а для его биологически активной формы.

Эти исследования в дальнейшем были продолжены с применением 20 МЕ 4-C^{14}-витамина $Д_3$ и равного количества 1,2-H^3-холестерина и определением их субклеточного распределения в слизистой тонкого кишечника и печени рахитичных цыплят (Norman a. oth., 1969). Одновременное введение эквивалентного количества холестерина проводилось с

Таблица 7

Распределение радиометки в субклеточных фракциях слизистой тонкого кишечника и печени рахитичных цыплят после внутривенного введения им 20 МЕ 4-C^{14}-витамина $Д_3$ и равного количества 1,2-H^3-холестерина (Norman a. oth., 1969)

Ткань	Субклеточная фракция	Процент извлеченной ДНК	Процент извлеченного C^{14} (витамин Д+метаболиты)	МЕ (витамин Д+метаболиты) на 1 *мг* ДНК×1000	Процент извлеченного H^3 (холестерин++метаболиты)	Отношение C^{14} к H^3
Слизистая кишечника	Гомогенат	100	100	22	100	0,50
	Неочищенные ядра	90	70	17	55	0,60
	Очищенные ядра	76	39	11	15	1,28
	Очищенный хроматин	67	43	14	9	2,61
Печень	Гомогенат	100	100	29	100	0,23
	Неочищенные ядра	93	49	16	53	0,27
	Очищенные ядра	70	5	2	10	0,13
	Очищенный хроматин	80	11	4	—	—

Примечание. Клеточное субфракционирование проводилось по Haussler, Myrtle, Norman (1968). Все процентные вычисления проводились исходя из расчета, что определяемые величины в гомогенатах принимались за 100%.

целью выяснения характера неспецифического связывания стероида субклеточными фракциями. Оказалось, что основная доля C^{14} (витамин Д и его метаболиты) в ядерной фракции слизистой тонкого кишечника локализуется в хроматиновой фракции, в то время как в последней концентрация трития (холестерин и его метаболиты) была незначительной (табл. 7).

ка, где, по-видимому, содержатся специфические рецепторные молекулы не для самого витамина Д, а для его биологически активной формы.

Эти исследования в дальнейшем были продолжены с применением 20 МЕ 4-C^{14}-витамина $Д_3$ и равного количества 1,2-H^3-холестерина и определением их субклеточного распределения в слизистой тонкого кишечника и печени рахитичных цыплят (Norman a. oth., 1969). Одновременное введение эквивалентного количества холестерина проводилось с

Таблица 7

Распределение радиометки в субклеточных фракциях слизистой тонкого кишечника и печени рахитичных цыплят после внутривенного введения им 20 МЕ 4-C^{14}-витамина $Д_3$ и равного количества 1,2-H^3-холестерина (Norman a. oth., 1969)

Ткань	Субклеточная фракция	Процент извлеченной ДНК	Процент извлеченного C^{14} (витамин Д+метаболиты)	МЕ (витамин Д+метаболиты) на 1 *мг* ДНК×1000	Процент извлеченного H^3 (холестерин+метаболиты)	Отношение C^{14} к H^3
Слизистая кишечника	Гомогенат	100	100	22	100	0,50
	Неочищенные ядра	90	70	17	55	0,60
	Очищенные ядра	76	39	11	15	1,28
	Очищенный хроматин	67	43	14	9	2,61
Печень	Гомогенат	100	100	29	100	0,23
	Неочищенные ядра	93	49	16	53	0,27
	Очищенные ядра	70	5	2	10	0,13
	Очищенный хроматин	80	11	4	—	—

Примечание. Клеточное субфракционирование проводилось по Haussler, Myrtle, Norman (1968). Все процентные вычисления проводились исходя из расчета, что определяемые величины в гомогенатах принимались за 100%.

целью выяснения характера неспецифического связывания стероида субклеточными фракциями. Оказалось, что основная доля C^{14} (витамин Д и его метаболиты) в ядерной фракции слизистой тонкого кишечника локализуется в хроматиновой фракции, в то время как в последней концентрация трития (холестерин и его метаболиты) была незначительной (табл. 7).

В отличие от кишечника в печени как C^{14}, так и H^3 локализованы в основном во фракции неочищенных от мембран ядер, а в очищенных от наружной оболочки ядрах и в хроматиновой фракции их концентрация незначительна. Таким образом, в печени не выявлено избирательной аккумуляции витамина Д ядерной хроматиновой фракцией, как это наблюдается в слизистой тонкого кишечника.

Таблица 8

Распределение радиометки в субклеточных фракциях слизистой тонкого кишечника рахитичных и интактных цыплят после внутривенного введения им C^{14}-витамина $Д_3$ и H^3-холестерина (Norman a. oth., 1969)

Фракция	Рахитичные (—Д) цыплята			Интактные (+Д) цыплята	
	% C^{14} (витамин+метаболиты)	% H^3 (холестерин+метаболиты)	отношение C^{14} к H^3	% C^{14} (витамин+метаболиты)	отношение C^{14} к H^3
Гомогенат	100	100	0,62	100	0,40
Митохондрии	8	17	0,30	17	0,39
Микросомы	6	17	0,20	15	0,32
Супернатант	12	4	1,67	7	0,51
Неочищенные ядра	75	65	0,71	68	0,39
Очищенные ядра	47	30	0,95	21	0,38
Ядерные мембраны	9	14	0,38	21	0,53
Хроматин	51	16	2,0	19	0,40
Хроматин, обработанный тритоном	50	3	10,0	1	0,10

Примечание. Интактные цыплята за 8 *час* до введения меченого витамина получали 5000 МЕ нерадиоактивного витамина $Д_3$. Поскольку содержание H^3 в субклеточных фракциях слизистой интактных цыплят было фактически одинаковым с концентрацией его у рахитичных цыплят, эти данные в таблице не приведены. Определяемые величины в гомогенатах принимались за 100%.

При сравнительном исследовании субклеточного распределения 10 МЕ C^{14}-витамина $Д_3$ и равного количества H^3-холестерина в слизистой тонкого кишечника у рахитичных и интактных цыплят было показано, что у последних концентрация C^{14} в ядерной хроматиновой фракции значительно ниже, чем у рахитичных (Norman a. oth., 1969) (табл. 8). Так же снижается содержание C^{14} во фракции неочищенных ядер с одновременным повышением концентрации C^{14} в митохондриальной и микросомальной фракциях. Эти явления авторы объясняют наличием ограниченного количества специфических рецепторов для витамина, вследствие чего при

насыщении им организма снижается процентное содержание витамина в хроматиновой фракции. Содержание же H^3 (холестерин и его метаболиты) в субклеточных фракциях слизистой кишечника у рахитичных и интактных цыплят оказалось идентичным.

Хроматиновый рецептор витамина Д был солюбилизирован раствором KCl в концентрации 0,15—0,30 М и содержал приблизительно 1,5, 1,0 и 0,5% общего количества соответственно белка, РНК и ДНК в гомогенате (Haussler, Norman, 1969). Путем обработки 15—30% $(NH_4)_2SO_4$ при 0° и дальнейшего осаждения протаминсульфатом произведена многократная очистка, и затем посредством хроматографии на сефадексе Г-200 и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы показана возможность существования рецептора в двух формах, имеющих молекулярный вес 50000—70000 и 200000. Связь радиоактивности с ядерной хроматиновой фракцией слизистой тонкого кишечника рахитичных цыплят после введения им меченого C^{14}-витамина $Д_3$ оказалась довольно прочной и метка экстрагировалась лишь при высоких значениях pH. Обработка РНК-азой и ДНК-азой понижала молекулярный вес, а проназой приводила к высвобождению радиометки из комплекса, на основании чего авторы предположили, что макромолекула рецептора, связывающая биологически активный метаболит витамина Д (пик 4В), представляет собой белок или более сложный белковый компонент. Связывающая способность рецептора насыщалась при дозе витамина $Д_3$ в 25—30 МЕ, а скорость насыщения зависела от дозы вводимого витамина. Было вычислено, что приблизительно 980 молекул метаболита пик 4В связывается хроматином одной клетки слизистой тонкого кишечника. Другие соединения из группы витамина Д, такие, как витамин $Д_2$, дигидротахистерины 2 и 3, связываются рецептором в меньших количествах, а дозы насыщения ими выше, что, по-видимому, в какой-то степени может объяснять их меньшую антирахитную активность для цыплят по сравнению с витамином $Д_3$.

Таким образом, эта группа исследователей не подтвердила данные Stohs и De Luca (1967) о преимущественной локализации витамина Д в ядерных мембранах слизистой тонкого кишечника рахитичных животных и пришла к заключению, что метаболически активная форма витамина Д селективно аккумулируется в ядерной хроматиновой фракции слизистой, где содержатся для него специфические рецепторные молекулы, по-видимому, типа белкового комплекса. Казалось бы, получена, наконец, довольно ясная картина субклеточного распределения витамина Д в органе-ми-

шени, которая в какой-то степени подтверждает предположение о том, что витамин Д инициирует процессы транскрипции и трансляции, в результате чего вырабатывается специфический белок, способствующий транспорту кальция в кишечнике, хотя вопрос, каким образом комплекс витамин Д + рецептор оказывает действие на активность генома, оставался открытым.

Однако дальнейшие исследования De Luca и сотр. подтверждают ранее выдвинутую ими концепцию о селективном накоплении физиологических доз витамина Д или его метаболитов в мембранах ядер слизистой тонкого кишечника, а не в хроматине. В частности, показано (De Luca, 1969a, b; Chen a. oth., 1970), что после введения меченых препаратов витаминов $Д_3$ и $Д_4$ в физиологических дозах рахитичным крысам и цыплятам 50—60% радиометки гомогената слизистой тонкого кишечника локализуется во фракции неочищенных ядер. При очистке ядер от мембранной фракции метка удаляется вместе с последней, исходя из чего авторы утверждают, что витамин Д локализуется главным образом именно в ядерных мембранах. Эти авторы предполагают, что обнаружение значительной доли витамина Д (или его метаболитов) в хроматиновой фракции слизистой тонкого кишечника (Haussler a. oth., 1968; Norman a. oth., 1969) связано, по-видимому, с загрязнением данной фракции ядерными мембранами. Они показали также, что очищенный хроматин аккумулирует лишь 1—7% радиометки слизистой тонкого кишечника у рахитичных крыс и цыплят после введения им меченых препаратов витамина Д.

Результаты наших исследований, проведенных на интактных крысах, свидетельствуют, что через 4 *час* после введения 600 МЕ 1,2-H^3-витамина $Д_3$ около 5% радиометки гомогената слизистой тонкого кишечника локализуется в ДНП фракции, в то время как очищенная ДНК оказалась практически нерадиоактивной (см. табл. 5). В отличие от ДНП слизистой тонкого кишечника, дезоксирибонуклеопротеид из гомогенатов печени, почек, тимуса и селезенки практически был лишен радиоактивности.

Анализ изложенных данных дает возможность полагать, что определенная часть витамина Д (или его биологически активных метаболитов) связывается с хроматином слизистой тонкого кишечника. Различия в результатах экспериментальных исследований по этому вопросу обусловлены, по-видимому, методическими трудностями в фракционировании субклеточных структур.

Дальнейшие подтверждения связывания витамина Д и его метаболитов с хроматином слизистой кишечника полу-

чены недавно японскими исследователями (Hosoya, Oku, 1971; Oku a. oth., 1971). Они обнаружили, что рецепторные молекулы в слизистой тонкого кишечника крыс, связывающие витамин $Д_3$ и его обменно-активные формы — 25-оксихолекальциферол, 1,25-диоксихолекальциферол, имеют коэффициент седиментации 13S, 8—8,6S и 3,5—4S. Рецепторы, локализующиеся в цитоплазматической фракции, отличались от ядерных рецепторов. Так, в состав последних входят ДНК, РНК и белок (7:1:9), а цитоплазматические рецепторы состояли из РНК и белка (1:44). Константы седиментации цитоплазматических и ядерных рецепторных молекул составляли соответственно 13S и 10S. Названные рецепторные молекулы имели высокую специфичность для витамина Д. Холестерин, 7-дегидрохолестерин, эстрадиол, тестостерон (соединения, родственные по своей химической структуре с витамином Д) не тормозили связывание витамина Д с рецепторными молекулами. Эти данные вносят новые представления о циторецепции витамина Д и его обменно-активных форм в пределах субклеточных структур слизистой тонкого кишечника. Авторы приходят к предположению, что названные рецепторные молекулы участвуют во внутриклеточном транспорте витамина Д и его активных метаболитов и, возможно, играют определенную роль в проявлении физиологического эффекта витамина Д. Можно ожидать, что дальнейшее изучение этих вопросов приблизит нас к пониманию молекулярных механизмов действия витамина Д.

Суммируя изложенное, нужно отметить, что в органах, не являющихся мишенями для витамина Д, последний обнаруживается во всех основных субклеточных фракциях, однако выраженной избирательности в распределении витамина Д при этом не выявлено. Напротив, в слизистой тонкого кишечника, где витамин Д оказывает свое основное действие на транспорт кальция, наблюдается селективная аккумуляция витамина в ядерной фракции, что, очевидно, имеет отношение к его механизму действия на уровне ядер. В частности, предполагается, что витамин Д или его метаболически активная форма вступает в комплексное соединение с ядерным рецептором и каким-то, еще не выясненным, путем дерепрессирует ген или гены, ответственные за образование белка — переносчика кальция. Разногласия по поводу преимущественной локализации витамина Д в пределах субъядерных фракций являются, по-видимому, результатом сложности получения абсолютно чистых препаратов хроматина или ядерных мембран, поскольку при сущест-

вующих методах фракционирования клетки не совсем исключена возможность их частичного загрязнения.

С нашей точки зрения, взаимодействие витамина Д или его метаболитов как с мембранными структурами, так и с хроматиновой фракцией слизистой тонкого кишечника может иметь существенное значение в механизме его действия на кишечный транспорт кальция.

Возможно, получение меченого витамина Д с чрезвычайно высокой удельной активностью поможет провести исследования методом клеточной авторадиографии и обеспечит получение новых сведений относительно субклеточного распределения витамина Д и его метаболитов.

К настоящему времени выяснено, что в субклеточных органеллах некоторых тканей содержится значительное количество активных форм витамина Д, однако они не все еще идентифицированы. Известные данные об их клеточном и субклеточном распределении будут более подробно рассмотрены ниже.

Важно подчеркнуть, что уже в пределах нескольких минут после введения животным радиоактивных препаратов витамина Д метка обнаруживается в ядерной и других субклеточных фракциях слизистой тонкого кишечника, а также в клетках костной ткани. Таким образом, очевидно, что латентный период в действии витамина Д не обусловлен задержкой в доставке его к месту действия.

Метаболиты витамина Д

В исследованиях Kodicek (1956) было обнаружено, что обмен витамина Д связан с образованием его метаболитов в различных органах. Эти метаболиты определялись в печени, костной ткани, толстом и тонком кишечнике с использованием системы бумажной хроматографии, и фактически не было получено никаких сведений об их химической структуре, однако указывалось, что они не обладают Д-витаминной активностью. Дальнейший прогресс в изучении метаболитов витамина Д непосредственно был связан с развитием и совершенствованием таких методов исследования, как газовая и газо-жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография, диск-электрофорез, масс-спектрометрия, определение спектров ультрафиолетового поглощения, ядерно-магнитный резонанс и других. Несомненно, важное значение при этом сыграло получение радиоактивных препаратов витамина Д, а затем и его метаболитов. При использовании этих методов в изучении обмена

витамина Д получены интересные сведения о метаболитах данного витамина.

Norman с сотр. (1964), Lund и De Luca (1966) путем хроматографии на колонке с кремневой кислотой и тонкослойной хроматографии метанол-хлороформенных экстрактов печени, почек, слизистой кишечника, сыворотки крови рахитичных крыс, предварительно получавших 500 МЕ H^3-витамина $Д_3$, показали, что многие ткани содержат по меньшей мере 4 метаболита витамина Д. Все они обладали определенной антирахитической активностью. Кроме того, один или несколько метаболитов удерживались в водной фазе, однако они не были идентифицированы и не обладали заметной активностью в излечивании рахита у крыс. При хроматографии липидных экстрактов тканей на колонке с кремневой кислотой применялась система градиента элюции с органическими растворителями возрастающей полярности, что дало возможность разделения витамина Д и его метаболитов. Предполагается, что в хроматографических системах подобного типа метаболиты, элюируемые после витамина Д, являются более полярными, а до витамина Д — менее полярными, чем сам витамин, так как для выделения этих метаболитов требуются растворители большей или меньшей полярности соответственно. При этом пик III, полученный на хроматограмме, был идентифицирован как неизмененный витамин Д, в то время как пики I и II содержали хроматографически менее, а пик IV — более полярные, по сравнению с витамином Д, метаболиты.

Метаболиты из пиков I и II оказались в 2—3 раза менее активными, чем витамин Д, в излечивании рахита у крыс. Их концентрация в крови и тканях как у людей (De Luca a. oth., 1967), так и у животных (Lund a. oth., 1967) была незначительной и не зависела от дозы и сроков введения витамина Д. На основании чего авторы предполагают, что, по-видимому, эти метаболиты не имеют существенного значения для биологического действия витамина Д.

Исследования, направленные на установление химической структуры метаболита из пика I, показали, что последний, очевидно, представлен эфиром витамина Д с боковой цепью жирных кислот (Lund a. oth., 1967). Подобное предположение основывалось на факте, что при хроматографии на колонке с кремневой кислотой синтетический эфир витамина Д с пальмитиновой кислотой мигрировал идентично метаболиту из пика I. В этом отношении интересны работы Bell, Bryan (1965), Fraser, Kodicek (1966, 1968), которые показали образование эфиров витамина Д in vivo. В частности, обнаружены пальмитаты, линолеаты, стеараты и олеа-

ты, содержание которых составляло соответственно 39, 16, 22 и 13%. Местом образования эфиров витамина Д, по-видимому, являются такие органы, как печень, почки и кишечник. Не исключена возможность эстерифицирования витамина Д в процессе абсорбции в желудочно-кишечном тракте (Bell, Bryan, 1965; Fraser, Kodicek, 1966, 1968). Подобное предположение было сделано авторами на основании того, что в кишечнике эфиры витамина Д обнаруживаются в более ранние сроки, чем в печени и в почках после введения животным витамина Д. В более ранних исследованиях было показано, что эфиры витамина Д обладают биологической активностью, хотя величина последней в значительной степени зависела от характера соединений. Так, дифенилацетат и оксалат витамина Д не обладали антирахитической активностью, в то время как биологическая активность пальмитата и бензоата была равна 50%, а ацетата (Rosenheim, Webster, 1927) и фосфата — 100% от активности витамина Д. Недавно при изучении антирахитической активности эфиров витаминов $Д_2$ и $Д_3$ установлено, что активность бутирата холекальциферола, ацетата, бутирата и пальмитата эргокальциферола составляет соответственно 80, 59, 72 и 61% по отношению к стандартному оргокальциферолу (Петрова и др., 1970). Биологическое значение образования эфиров витамина Д до сих пор не выяснено. Учитывая их меньшую антирахитическую активность по сравнению с самим витамином Д, можно предположить, что они являются формой «хранения» или, возможно, формой выделения витамина Д.

Японскими исследователями было обнаружено значительное количество сульфата витамина Д в большеберцовой кости рахитичных цыплят, которым предварительно вводили витамин $Д_3$ (Sahashi a. oth., 1962; Tanaka a. oth., 1963). В последующем из мочи и гомогената печени кроликов, получавших 200 000 МЕ витамина $Д_2$, был выделен сульфат, хроматографическая характеристика которого оказалась идентичной таковой сульфата витамина $Д_2$, синтезированного химическим путем (Higaki a. oth., 1965a). Предполагается, что ферментативная система, ответственная за синтез сульфата витамина Д, локализуется главным образом в печени (Higaki a. oth., 1965b). Дальнейшими исследованиями выявлено содержание значительной концентрации сульфата витамина Д в женском и коровьем молоке, причем основная доля сульфата находилась в водорастворимой форме. Сульфат витамина Д оказался малотоксичным для мышей и крыс и обладал равной с витамином Д антирахитической активностью (Sahashi a. oth., 1967). На основании этих дан-

ных авторы предполагают наличие связи между синтезом сульфата витамина Д и выражением его физиологического эффекта. Возможно, превращение жирорастворимого витамина в водорастворимый сульфат, обнаруживаемый в молоке, облегчает усвоение витамина Д в желудочно-кишечном тракте, что, по-видимому, особенно важно для новорожденных, у которых основной пищей является молоко. Кроме того, известно, что в младенческом возрасте жир в желудочно-кишечном тракте усваивается хуже, чем у взрослых. Нужно отметить, однако, что наличие в молоке коровы холекальциферола или эргокальциферола в виде сульфата не было обнаружено в более поздних исследованиях (Паламарчук, Вендт, 1969) с применением метода тонкослойной хроматографии.

Метаболит из пика II до сих пор еще не идентифицирован, хотя по своим хроматографическим свойствам он отличается от превитамина Д или от 5,6-*транс*-витамина Д (De Luca, 1967). Его количество в организме оказалось незначительным независимо от дозы и сроков введения витамина, и это дает возможность предположить малую физиологическую значимость данного метаболита.

В дальнейших исследованиях показано, что пик IV содержит несколько метаболитов (Morii a. oth., 1967). Щелочной гидролиз не изменяет хроматографические свойства метаболитов, и это свидетельствует, что они не являются конъюгатами или комплексами витамина Д. Метаболиты оказались более полярными, чем сам витамин Д, и обнаруживались в довольно значительном количестве в различных органах.

Изолированные из пика IV метаболиты при введении их витамин Д-дефицитным крысам стимулировали транспорт кальция в кишечнике и повышали концентрацию кальция в сыворотке крови, подобно самому витамину Д (Morii a. oth., 1967). Более того, данные метаболиты вызывали физиологический эффект намного быстрее, чем сам витамин Д. Например, оральная доза витамина $Д_3$ в 10 МЕ повышала кишечный транспорт кальция через 20 *час*, в то время как метаболиты, изолированные из организма в составе пика IV, вызывали подобный эффект уже через 8—10 *час* после введения их в соответствующей дозе. Хроматографически более полярные, чем сам витамин Д, метаболиты были обнаружены и в сыворотке крови людей, получавших 10 000 МЕ витамина Д (Avioli a. oth., 1967). Эти данные убедительно показали возможность образования в организме биологически активных метаболитов витамина Д. В связи с этим возникли некоторые новые проблемы, решение которых оказало бы

существенное влияние для более полного понимания механизма действия витамина Д. Во-первых, было необходимо изолировать в чистом виде и идентифицировать химическую структуру метаболически активных форм витамина Д. Во-вторых, точно установить, обязательно ли для проявления физиологического эффекта метаболизирование витамина в биологически активную форму, и если да, то выявить органы и ткани, «ответственные» за этот процесс. В-третьих, определить биологическую активность метаболитов в отношении всех или основных сторон действия витамина Д, таких как влияние на кишечный транспорт кальция, на процессы резорбции костной ткани, содержание кальция и фосфора в крови, участие в регуляции обмена нуклеиновых кислот и белка в органах-мишенях, чувствительность этих процессов на введение ингибиторов синтеза белка и нуклеиновых кислот и другие.

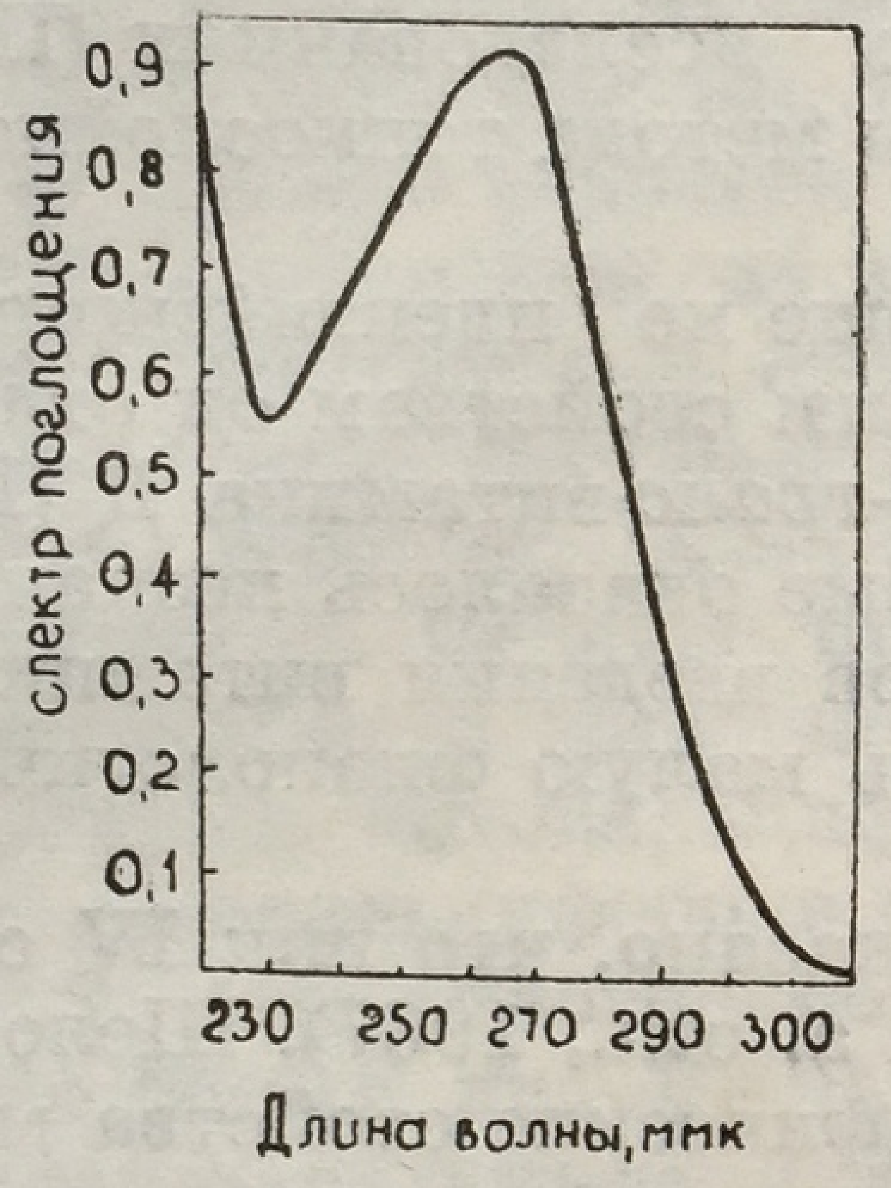


Рис. 3. Ультрафиолетовый спектр метаболита витамина $Д_3$ из хроматографического пика IV (25-оксихолекальциферол) (Blunt a. oth., 1968a).

В последующем метод хроматографического разделения метаболитов витамина Д был усовершенствован (Ponchon, De Luca, 1969; Suda a. oth., 1970). Оказалось, что пик IV состоит по меньшей мере из восьми метаболитов, обозначенных как пики IVa, IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIIa и VIIb, каждый из которых являлся хроматографически более полярным по сравнению с самим витамином Д.

Из пика IV было изолировано в чистом виде соединение, которое путем определения спектра ультрафиолетового поглощения (рис. 3), газо-жидкостной хроматографии, ядерно-магнитного резонанса и масс-спектрометрии идентифицировано как 25-оксихолекальциферол (Blunt a. oth., 1968a). Тот факт, что спектр ультрафиолетового поглощения идентичен таковому витамина Д и что при газо-жидкостной хроматографии обнаруживается двойной пик подобно пиро- и изопирокальциферолу, указывает на неизмененность триеновой системы метаболита по сравнению с исходным витамином $Д_3$.

Молекулярный вес метаболита соответствовал 400, что равняется молекулярному весу оксивитамина $Д_3$. Витамин $Д_3$ и метаболит дают идентичные фрагменты при массовом числе m/e 271 и это указывает, что гидроксильная группа

может быть локализована в боковой цепи молекулы. Наличие фрагмента m/e 59 у метаболита, но не у исходного витамина $Д_3$, явно подтверждает, что гидроксил расположен в 25-положении. Характер спектров ЯМР, в частности наличие синглета при σ 1,2 и отсутствие дублета при σ 0,87, характерного для витамина Д и указывающего на взаимодействие метильных групп в положениях 26 и 27 не с гидроксилом, а с третичным водородом, также подтверждает этот вывод. Таким образом, приведенные выше данные убедительно показывают, что изолированный метаболит является по своей химической структуре 25-оксиформой витамина $Д_3$, т. е. 25-оксихолекальциферолом (25-ОХК). 25-оксихолекальциферол обнаружен и выделен из плазмы и других тканей у свиней (Blunt a. oth., 1968b, c; De Luca, 1969a, c), крыс (Ponchon, De Luca, 1969a; Ponchon a. oth., 1969), цыплят (Lawson a. oth., 1969a; Myrtle a. oth., 1970) и людей (Mawer a. oth., 1971b) после введения им различных доз витамина $Д_3$, меченного C^{14} или H^3. Было показано также, что у людей обмен витамина Д зависит от количества его, поступающего с пищей. Так, при введении витамина $Д_3$ людям с низким содержанием его в крови наблюдалось более быстрое превращение холекальциферола в 25-оксихолекальциферол по сравнению с людьми, заранее получавшими витамин Д.

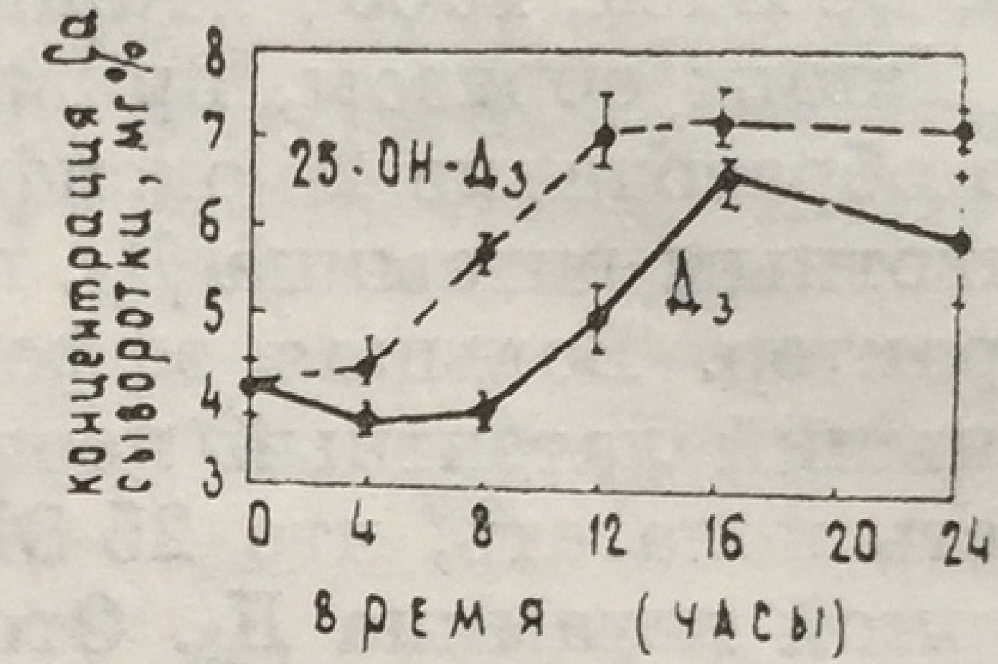


Рис. 4. Повышение концентрации сывороточного кальция у витамин Д-дефицитных крыс, содержавшихся на низкокальциевой диете после введения им 2,5 *мкг* витамина $Д_3$ или 2,5 *мкг* 25-оксихолекальциферола (Blunt a. oth., 1968d).

Биологическая активность 25-оксихолекальциферола, оцениваемая по способности излечивать рахит у крыс, оказалась в 1,4 раза выше, чем у витамина $Д_3$ (De Luca, 1969b, c). Подобные данные обнаружены и в других исследованиях (Blunt a. oth., 1968a, b, c, d). 25-ОН-витамин $Д_3$ обладал большей активностью по сравнению с холекальциферолом также в отношении стимуляции кишечного транспорта кальция (Blunt a. oth., 1968a, b; Olson, De Luca, 1969), мобилизации его из костной ткани (Blunt a. oth., 1968a, b, d) (рис. 4) и в повышении концентрации сывороточного кальция (Blunt a. oth., 1968b). Особый интерес представляет факт, что эти процессы наблюдаются намного раньше после введения 25-оксихолекальциферола по сравнению с эффектом самого витамина $Д_3$. Так, физиологическая доза (10 МЕ) 25-оксихолекальциферола инициирует кишеч-

ный транспорт кальция у крыс в пределах 3 *час* после его введения, в то время как подобная доза витамина $Д_3$ требует 8—10 *час* для инициации процесса повышения транспорта кальция (Blunt a. oth., 1968b). Повышение же уровня сывороточного кальция у рахитичных крыс после введения им 2,5 *мкг* 25-оксихолекальциферола происходит через 8 *час*, в то время как после применения 2,5 *мкг* витамина $Д_3$ возникает легкая реакция лишь через 12 *час*. Кроме того, 25-оксихолекальциферол в незначительных концентрациях способен оказывать свое действие и в изолированных тканях-мишенях. Витамин $Д_3$ в этом случае неэффективен (Olson, De Luca, 1969; Trummel a. oth., 1969).

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют, что образование 25-оксиформы после введения рахитичным животным витамина $Д_3$, по-видимому, носит универсальный характер. Большая эффективность данного метаболита и меньший латентный период в его действии дают возможность полагать, что 25-OH-витамин $Д_3$ является активной формой витамина $Д_3$. Отсутствие же действия витамина $Д_3$ in vitro в отличие от 25-оксихолекальциферола, вероятно, обусловлено тем, что подобное метаболизирование витамина, во-первых, происходит в условиях организма, во-вторых, является обязательным для выражения физиологического действия витамина Д. В этом отношении интересно рассмотреть исследования, проведенные с 25-оксиформами аналогов витамина $Д_3$ и выяснением органов, ответственных за метаболизирование витамина $Д_3$ в 25-оксихолекальциферол.

Изучение кинетики распределения радиоактивности после введения рахитичным крысам меченых препаратов витамина $Д_3$ показало наличие трехфазного характера изменения концентрации радиометки в крови: быстрое уменьшение концентрации метки в плазме после внутривенного инъецирования препарата; повышение радиоактивности плазмы; постепенное исчезновение радиометки из крови (Ponchon, De Luca, 1969a). Первая и вторая фазы по времени совпадали соответственно с быстрым повышением и последующим уменьшением концентрации меченого препарата в печени. При этом исчезновение радиоактивности в печени сопровождалось появлением в крови меченого 25-оксихолекальциферола, в связи с чем авторы предположили, что местом образования 25-оксиформы витамина $Д_3$ является печень. Исследование метаболизма витамина $Д_3$ при почти полном выключении печени из кровообращения путем наложения портокавального анастомоза, перевязки печеночной артерии и общего желчного протока показало, что в данных случаях витамин $Д_3$ практически не превращается в 25-ок-

сихолекальциферол (Ponchon a. oth., 1969). Эти данные позволяют предполагать, что печень является основным, если не единственным, органом, где происходит гидроксилирование витамина $Д_3$ в 25-оксихолекальциферол (Horsting, De Luca, 1969).

Если верно предположение, что витамин $Д_3$ до оказания им физиологического эффекта должен преобразоваться в 25-оксиформу, то подобное явление можно ожидать и в отношении других витаминов группы Д, поскольку аналоги витамина $Д_3$ вызывают в организме идентичный эффект. В этом плане проведены исследования с витамином $Д_2$ и дигидротахистерином$_3$.

Из печени свиней, получавших в течение 26 дней по 400 000 МЕ витамина $Д_2$, был впервые изолирован полярный, биологически активный метаболит, который по хроматографическим и спектрофотометрическим свойствам идентифицирован как 25-оксиэргокальциферол (Suda a. oth., 1969). В последующем 25-оксиэргокальциферол (25-ОЭК) был изолирован из смеси плазмы свиней и крыс и идентифицирован путем использования хроматографических методов, масс-спектрометрии, определения ультрафиолетового спектра и изучения спектров ядерно-магнитного резонанса (Suda a. oth., 1970c). 25-Оксиэргокальциферол так же, как и 25-оксихолекальциферол, оказался в 1,5 раза эффективнее, чем витамины $Д_2$ и $Д_3$ при излечивании рахита у крыс (его антирахитическая активность была равна 60 МЕ/*мкг*) (Suda a. oth., 1970c). Он обладал большей эффективностью в индукции кишечного транспорта кальция (табл. 9) и мобилизации костного минерала у крыс (рис. 5) и намного быстрее действовал на эти две системы, чем сам витамин $Д_2$.

Таблица 9

Эффективность витамина $Д_2$ и 25-оксиэргокальциферола при стимуляции транспорта кальция в кишечнике

Время после введения препарата, *час*	Ca^{45} серозы/Ca^{45} слизистой (M ± m)	
	Витамин $Д_2$	25-ОН-витамин $Д_2$
0	1,50 ± 0,14	
3	1,40 ± 0,39	1,94 ± 0,41 $P<0,05$
4	1,54 ± 0,36	2,09 ± 0,65
6	1,88 ± 0,30 $P<0,05$	2,74 ± 0,49 $P<0,01$
8	2,06 ± 0,12 $P<0,001$	3,51 ± 0,23 $P<0,001$
12	3,35 ± 0,70 $P<0,01$	3,58 ± 0,59 $P<0,001$

Примечание. Крысам внутривенно вводили 0,25 *мкг* витамина $Д_2$ или 25-ОЭК. Животные контрольной группы получали соответствующее количество растительного масла.

25-оксидигидротахистерин$_3$ (25-ОДГТ$_3$), синтезированный аналог дигидротахистерина$_3$, также обладал бо́льшей антирахитической активностью (табл. 10), способностью инду-

цировать костную мобилизацию, кишечный транспорт кальция и повышать уровень сывороточного кальция по сравнению с дигидротахистерином (Suda a. oth., 1970d). Идентификация синтезированного 25-оксидигидротахистерина проводилась теми же методами, которые применялись для 25-оксипроизводных витаминов $Д_2$ и $Д_3$.

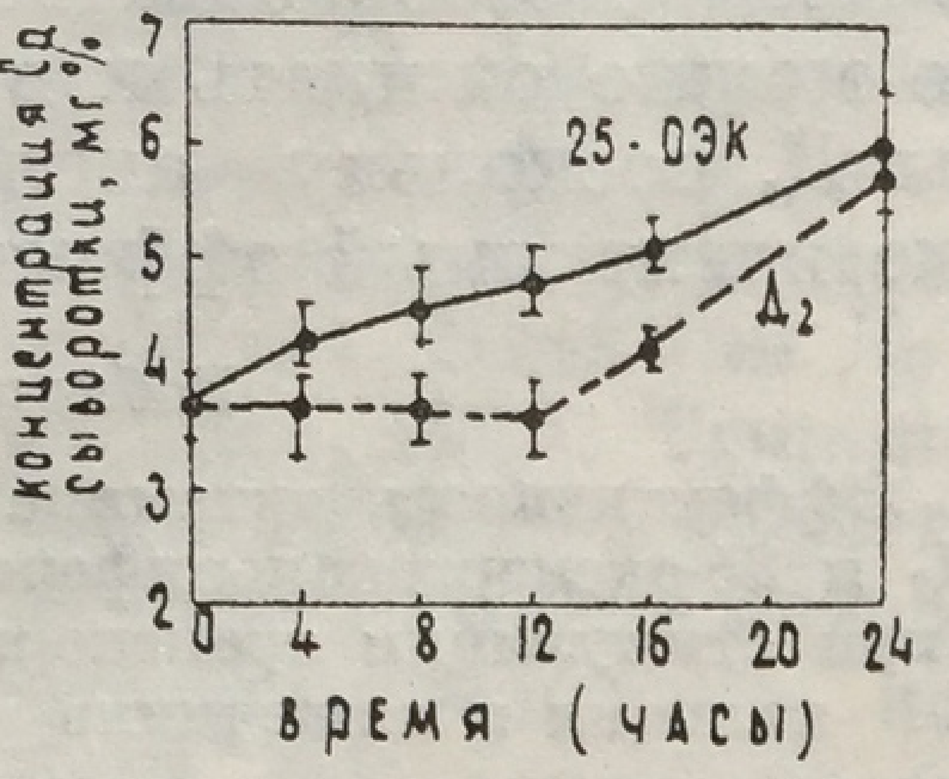


Рис. 5. Повышение концентрации сывороточного кальция у витамин-Д-дефицитных крыс, содержавшихся на низкокальциевой диете после введения им 2,5 *мкг* витамина $Д_2$ или 2,5 *мкг* 25-оксиэргокальциферола (Suda a. oth., 1970c).

25-оксидигидротахистерин, по аналогии с 25-оксихолекальциферолом, оказался эффективным агентом, стимулирующим мобилизацию костного минерала и в тканевой культуре. Это было показано в опытах при изучении влияния дигидротахистерина$_3$ и 25-оксидигидротахистерина$_3$ на рассасывание костной ткани, культивируемой предварительно в среде, содержащей Ca^{45} (Trummel a. oth., 1971). При этом было выявлено, что дигидротахистерин$_3$ в концентрации до 150 *мкг/мл* не оказывал существенного влияния на мобилизацию Ca^{45} из кости в среду, тогда как в присутствии 25-оксидигидротахистерина даже в значительно меньшей концентрации (0,15 *мкг/мл*) наблюдалось повышение скорости выхода Ca^{45} в среду. Величина эффекта была сопоставима с аналогичным действием паратиреоидного гормона и 25-оксихолекальциферола. На основании этих данных авто-

Таблица 10

Сравнительная антирахитическая активность 25-оксидигидротахистерина$_3$ у крыс (Suda a. oth., 1970d)

Препарат	Активность, МЕ/*мкг*	Отношение к активности витамина $Д_3$	Литература
Витамин $Д_2$	40	1,0	
Витамин $Д_3$	40	1,0	
25-ОЭК	60	1,5	
25-ОХК	56	1,5	Suda a. oth., 1970b
Дигидротахистерин$_2$	0,09	$^1/_{450}$	Blunt a. oth., 1968b
Дигидротахистерин$_3$	0,16	$^1/_{250}$	Werder, 1939
25-ОДГТ$_3$	0,8	$^1/_{50}$	

ры приходят к заключению, что гидроксилирование молекулы дигидротахистерина в 25-положении является необходимым этапом, обеспечивающим его способность стимулировать мобилизацию костного минерала.

Таким образом, 25-оксидигидротахистерин$_3$, полученный путем химического синтеза, является (по аналогии с 25-оксипроизводными витаминов Д$_2$ и Д$_3$) более активным и действует быстрее на обмен кальция, чем сам дигидротахистерин$_3$. Следовательно, можно полагать, что дигидротахистерины также должны гидроксилироваться в 25-положении, прежде чем они станут эффективными. В этом отношении представляет интерес, что 25-оксихолекальциферол, полученный путем химического синтеза, по своим физико-химическим свойствам и биологической активности, оцениваемой по способности излечивать рахит, стимулировать транспорт кальция в кишечнике и мобилизацию кальция из костной ткани, оказался полностью идентичным с 25-оксихолекальциферолом, изолированным из тканей животных (Blunt, De Luca, 1969).

Изложенные выше данные позволяют предположить, что витамин Д проявляет свое действие в форме биологически активных метаболитов. В связи с этим представляет интерес изучение распределения метаболитов витамина Д и влияния их на синтетические процессы в клетке.

Хроматография хлороформных экстрактов из неочищенной ядерной фракции слизистой тонкого кишечника рахитичных цыплят, получавших 10 МЕ H^3-витамина Д$_3$ за 8 *час* до забоя, показала, что приблизительно 80% радиоактивности связано с фракцией 25-оксихолекальциферола (De Luca, 1969c). Следовательно, в ядерной фракции слизистой кишечника аккумулируется главным образом не сам витамин Д, а его обменно-активная форма. О значительном накоплении метаболитов витамина Д в слизистой кишечника свидетельствуют также результаты исследований с применением меченых препаратов 25-оксихолекальциферола (табл. 11) (Cousins a. oth., 1970b).

Неочищенная ядерная фракция слизистой тонкого кишечника аккумулирует приблизительно 57 и 27% общей клеточной радиоактивности после предварительного введения животным соответственно 0,025 и 0,25 *мкг* 25-оксихолекальциферола. Как видно из таблицы 11, малые дозы препарата селективно аккумулируются ядерной фракцией слизистой тонкого кишечника, что согласуется с представлением о действии 25-оксихолекальциферола на уровне генетического аппарата клеток тканей-мишеней. Более того, показана стимулирующая роль 25-оксихолекальциферола на

Таблица 11

Субклеточное распределение H^3-25-оксихолекальциферола в слизистой тонкого кишечника крыс

Фракция	Доза, *мкг*	Время после введения препарата, *мин*					
		7,5	15	30	60	120	180
Ядра неочищенные	0,25	—	26,9	31,5	32,2	21,7	—
Митохондрии	0,25	—	6,3	6,3	5,5	5,6	—
Микросомы	0,25	—	10,9	9,7	9,4	9,9	—
Супернатант	0,25	—	52,5	51,0	52,3	58,9	—
Ядра неочищенные	0,025	56,7	41,8	48,4	41,8	52,6	48,3
Митохондрии	0,025	5,4	6,3	6,3	3,8	2,5	2,3
Микросомы	0,025	15,5	13,3	14,0	14,6	7,6	6,9
Супернатант	0,025	22,4	38,6	31,3	39,8	37,3	42,5

Примечание. Данные выражены в % от тотальной клеточной радиоактивности.

биосинтез ядерной РНК в слизистой тонкого кишечника рахитичных крыс, причем данный процесс происходит быстрее, чем при применении самого витамина $Д_3$ (Cousins a. oth., 1970b). Это наводит на мысль, что первичный ответ на введение витамина Д в виде стимуляции скорости биосинтеза РНК и белка в тканях-мишенях обусловлен не самим витамином Д, а его биологически активным метаболитом или метаболитами.

Дальнейшие исследования показали, что 25-оксихолекальциферол метаболизирует в организме в более полярные соединения. Так, при хроматографии липидных экстрактов тканей витамин Д-дефицитных крыс, которым предварительно вводили меченый 25-оксихолекальциферол, было обнаружено, что последний быстро метаболизирует с образованием хроматографически более полярных метаболитов, обозначенных на хроматограммах как пики V, VI и VII (Cousins a. oth., 1970a, b; Ponchon a. oth., 1970). Пик V элюировали 5% метанолом в эфире, пик VI — 50% метанолом в эфире, а пик VII — в 100% метаноловом градиенте. Пик IV соответствовал неизмененному 25-оксихолекальциферолу. Указанные метаболиты обнаруживались в сыворотке крови и слизистой тонкого кишечника уже в пределах нескольких минут после введения животным 25-оксихолекальциферола (табл. 12).

При субфракционировании гомогената слизистой тонкого кишечника более полярные, чем 25-оксихолекальциферол, метаболиты обнаруживались главным образом в ядер-

Таблица 12

Распределение H^3-содержащих метаболитов в сыворотке крови и слизистой тонкого кишечника рахитичных крыс после введения им 0,25 *мкг* (26, 27-H^3)-25-оксихолекальциферола (Cousins a. oth., 1970b)

Метаболит (пик)	Время после введения препарата, *мин*					
	3	15	30	60	120	180
			Сыворотка			
IV	—	69,8	74,7	91,5	88,6	88,9
V	—	7,9	3,1	3,8	7,1	7,7
VI	—	10,3	1,8	3,0	4,3	1,9
VII	—	12,0	20,4	1,7	0	1,5
			Кишечник			
IV	82,2	56,7	44,4	57,6	—	52,7
V	9,7	9,6	8,2	10,2	—	25,7
VI	8,1	33,7	47,4	33,2	—	21,6

Примечание. Результаты выражены в % от тотального количества метки, элюированного из колонки.

ной фракции, что, возможно, свидетельствует об их роли в действии витамина на уровне ядер ткани-мишени. Представляет интерес, что с течением времени после введения 25-оксихолекальциферола изменяется соотношение содержания метаболитов. Временной порядок появления этих метаболитов и изменение их относительного содержания в тканях (рис. 6) приводит к мысли, что пик VI, возможно, является предшественником пика V. Подобный характер метаболизирования 25-оксихолекальциферола более выражен при применении меньших доз препарата. На основании малого содержания полярных метаболитов в цитоплазматической фракции по сравнению с ядерной фракцией слизистой тонкого кишечника авторы приходят к предположению, что они, по-видимому, имеют ядерное происхождение. Однако эти эксперименты не исключают возможность образования

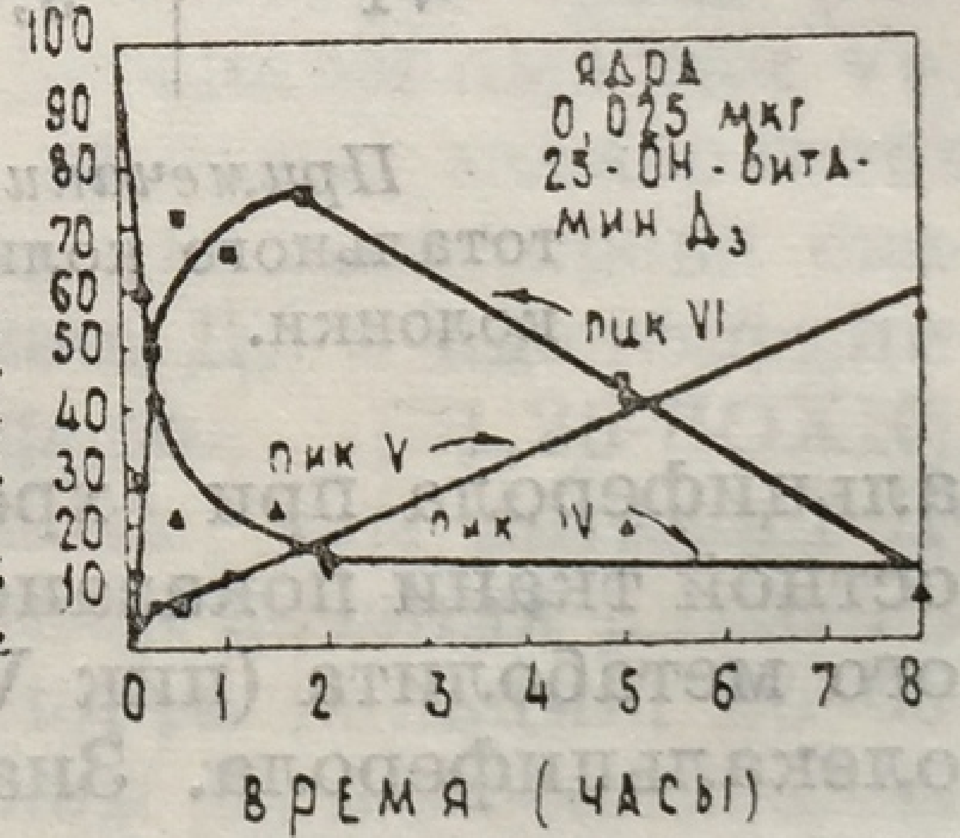


Рис. 6. Превращение 26, 27-H^3-25-оксихолекальциферола (пик IV) в другие метаболиты (пики V и VI), обнаруживаемые в ядрах слизистой тонкого кишечника крыс. Меченый оксихолекальциферол вводился животным внутривенно в дозе 0,025 *мкг* (Cousins a. oth., 1970b).

полярных метаболитов или некоторых из них в других органах с последующим поступлением их с кровью к тканям-мишеням, как это наблюдается в случае с 25-оксихолекальциферолом. Такая возможность не исключена хотя бы потому, что подобные метаболиты обнаружены и в других органах (Cousins a. oth., 1970a). Так, через 24 *час* после введения рахитичным крысам 0,025 *мкг* H^3-25-оксихоле-

Таблица 13

Распределение H^3-содержащих метаболитов в печени и почках крыс после введения им 0,025 *мкг* H^3-25-оксихолекальциферола
(Cousins a. oth., 1970a.)

Метаболит (пик)	Время после введения препарата, *час*				
	2	5	8	12	24
			Печень		
IV	80,3	66,4	62,2	47,4	45,7
V	14,9	27,5	31,6	47,2	46,7
VI	4,8	6,1	6,2	5,4	7,6
			Почка		
IV	80,8	—	—	56,2	54,2
V	16,2	—	—	30,6	45,8
VI	3,0	—	—	13,2	0

Примечание. Результаты выражены в % от тотального количества метки, элюированного из колонки.

кальциферола при хроматографии липидных экстрактов костной ткани показано, что в последней содержание полярного метаболита (пик V) превышало концентрацию 25-оксихолекальциферола. Значительные количества хроматографически полярных метаболитов обнаружены также в липидных экстрактах печени и почек (табл. 13) рахитичных крыс, получавших 25-оксихолекальциферол.

Таким образом, витамин Д в организме метаболизирует в биологически активную форму — 25-оксипроизводное витамина, которая, в свою очередь, быстро превращается в хроматографически более полярные метаболиты. Значение этих процессов до сих пор еще не выяснено. Однако изучение биологической активности 25-оксипроизводных, выяснение кинетики появления и распределения метаболитов в тканях и субклеточных структурах дало возможность предположить, что, во-первых, трансформация молекулы витамина Д в 25-оксипроизводное является необходимым звеном в си-

стеме метаболизма, направленном на проявление физиологического эффекта витамина, и, во-вторых, 25-оксиметаболиты, возможно, являются циркулирующими или гормонально активными формами, а метаболиты из пиков V и/или VI — регуляторными формами витамина на уровне органов-мишеней, продуцируемыми в тканях из 25-оксипроизводных (Cousins a. oth., 1970a, b). Такой механизм может объяснять специфичность и дифференцировку в выражении физиологического действия витамина Д в различных тканях. В этом отношении представляют интерес аналогичные в некоторой степени результаты, полученные при исследовании метаболизма некоторых гормонов. Так, Brushovsky и Wilson (1968) сообщили о том, что тестостерон превращается в органах-мишенях в биологически активные метаболиты. Авторы предполагают, что подобная трансформация молекул гормона в метаболически активные формы катализируется ферментами, присутствующими только в тестостерончувствительных тканях. Физиологическое значение преобразования молекулы андрогена в активную форму обсуждается в монографии П. В. Сергеева и сотр. (1971).

В последующем были предприняты попытки разделения и идентификации метаболитов из пиков V и VI. С помощью высокой степени очистки путем хроматографии на колонке с кремневой кислотой было показано, что пик V крови распадается на три большие компонента, обозначенные как Va, Vb и Vc (Suda a. oth., 1970). Первый из этих метаболитов (Va) был изолирован в чистом виде из плазмы крови свиней, получавших высокие дозы витамина $Д_3$, и идентифицирован как 21,25-диоксихолекальциферол (21,25-ДОХК). Этот метаболит оказался менее активным, чем витамин $Д_3$ или 25-оксихолекальциферол в отношении лечения рахита у крыс и стимуляции кишечного транспорта кальция, но более активным по сравнению с витамином $Д_3$ в мобилизации костного минерала (табл. 14). Таким образом, 21,25-диоксихолекальциферол оказывает преимущественное действие на резорбцию костного минерала, т. е. обладает избирательной активностью.

Несколько позднее Suda с сотр. (1970a) с использованием идентичных методов исследования из пика Vc изолировали в чистом виде другой метаболит, который был идентифицирован как 25,26-диоксихолекальциферол (структурные формулы 21,25- и 25,26-диоксихолекальциферола представлены на рис. 7). Этот метаболит обладает некоторой активностью в стимуляции кишечного транспорта кальция (табл. 14), но фактически не оказывает действия на мобили-

Таблица 14

Влияние витамина $Д_3$ и его метаболитов на обмен кальция у крыс, содержащихся на низкокальциевой диете (Suda a. oth., 1970a, b)

Препарат	Транспорт кальция (Ca^{45} серозы/Ca^{45} мукозы)		Мобилизация костного Са(Са сыворотки, *мг %*)	
	0,25 *мкг*	2,5 *мкг*	0,25 *мкг*	2,5 *мкг*
Контроль	1,6±0,2 (4)	1,5±0,3 (5)	4,7±0,1 (4)	4,4±0,4 (5)
21,25-ОН-вит. $Д_3$	—	2,6±0,5 (5)	—	6,5±0,2 (5)
25,26-ОН-вит. $Д_3$	2,8±0,6 (5)	—	5,1±0,2 (5)	—
25-ОН-вит. $Д_3$	4,0±0,5 (3)	5,9±1,6 (5)	6,6±0,6 (3)	7,3±0,5 (5)
Витамин $Д_3$	—	—	—	5,0±0,5 (5)

Примечание. Препараты вводили в дозах 0,25 *мкг* и 2,5 *мкг* за 12 *час* до определений. Числа в скобках показывают количество животных в каждой группе.

зацию костного минерала и не обладает антирахитическим эффектом.

Таким образом, гидроксилирование молекулы 25-оксихолекальциферола в 21-положении приводит к образованию

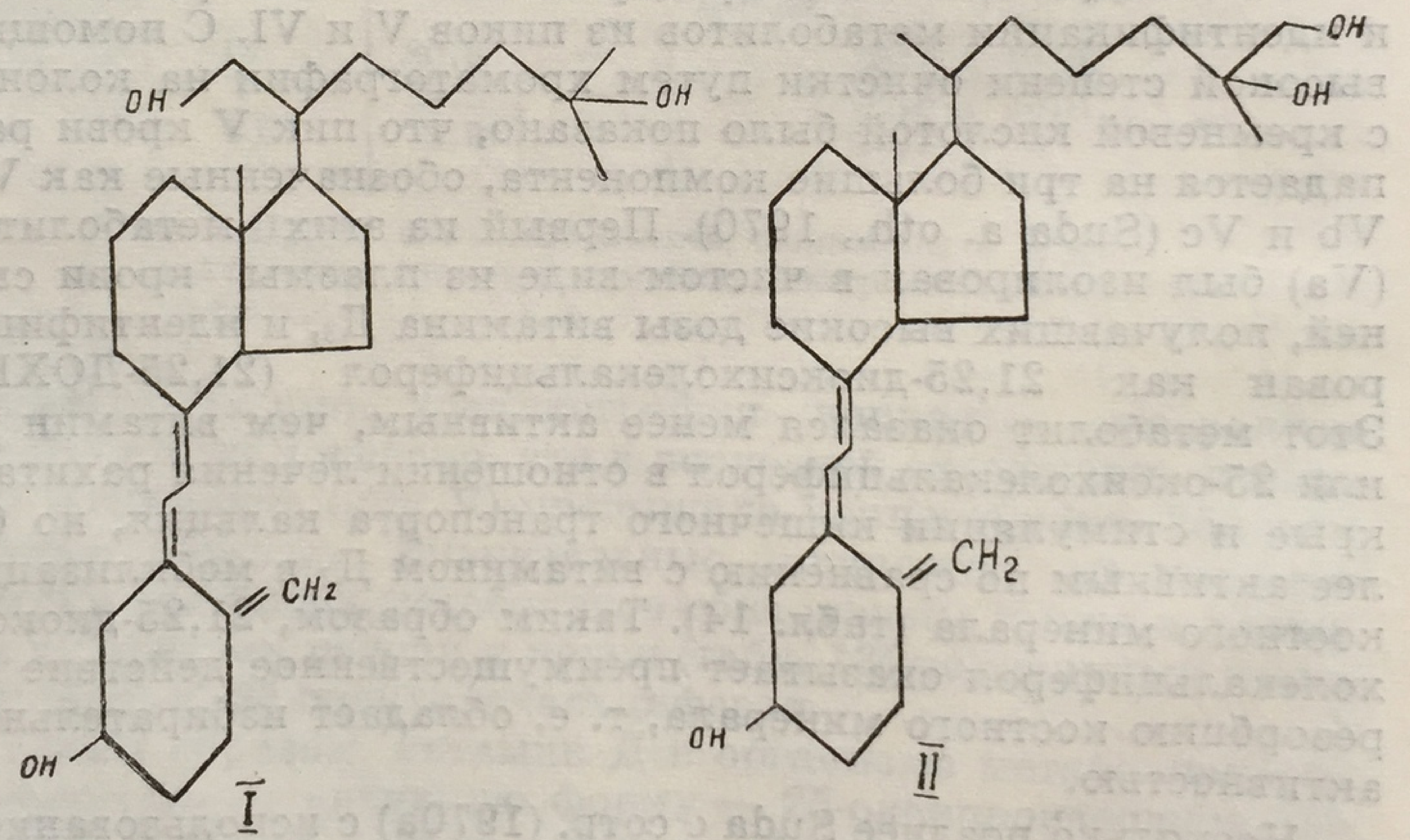


Рис. 7. Структурные формулы 21, 25-диоксихолекальциферола (I) и 25, 26-диоксихолекальциферола (II).

компонента с преимущественным действием на костную ткань, в то время как при гидроксилировании в 26-положении образуется соединение, обладающее значительной активностью только в кишечнике. Нужно отметить, что данные эксперименты не дают ответа о точной локализации

образования этих метаболитов, но ясно показывают следующую последовательность метаболических превращений витамина Д$_3$: витамин Д$_3$— 25-оксихолекальциферол — 21, 25- и 25,26-диоксихолекальциферолы. Биологическая роль этих процессов полностью пока не выяснена. Однако можно предположить, что 25-оксиформа витамина Д является, по-видимому, циркулирующей или гормонально активной формой, а дальнейшая трансформация молекулы 25-ОХК в различные биологически активные метаболиты, происходящая, возможно, в органах-мишенях, обусловливает специфичность действия витамина Д в кишечнике и костной ткани (Suda a. oth., 1970a, b). Альтернативной интерпретацией метаболизирования 25-оксихолекальциферола в 21,25- и 25, 26-диоксихолекальциферолы может быть предположение, что последние являются продуктами инактивации, направленной на лимитирование синтеза компонентов системы транспорта кальция, инициированного витамином Д или его активной формой. Меньшая биологическая активность 21, 25- и 25,26-диоксихолекальциферолов по сравнению с 25-оксихолекальциферолом поддерживает вторую гипотезу.

В последние годы интенсивное изучение метаболизма витамина Д проводится в ряде лабораторий с применением различных методов исследования, в том числе и разных хроматографических систем. Эти обстоятельства и факт, что у многих метаболических форм витамина Д еще не установлена химическая структура, не позволили унифицировать обозначения неидентифицированных метаболитов, полученных в разных лабораториях, в связи с чем возникали некоторые затруднения в интерпретации полученных результатов. Однако, как и следовало ожидать, оказалось, что некоторые метаболиты, изолированные в различных лабораториях и, следовательно, обозначенные по-разному, имеют идентичную химическую структуру.

Norman и сотр. обнаружили, что биологически активный полярный метаболит холекальциферола, обозначенный как метаболит IVB (Hibberd, Norman, 1969; Myrtle a. oth., 1970), селективно аккумулируется в пределах ядер слизистой тонкого кишечника (Haussler, Norman, 1967; Haussler a. oth., 1968) путем связывания с ядерным рецепторным белком (Haussler, Norman, 1969). Хроматографически полярный метаболит IVA, присутствующий в крови и слизистой кишечника цыплят (Myrtle a. oth., 1970), по своим биологическим свойствам и хроматографической подвижности оказался идентичным с 25-оксихолекальциферолом (Myrtle, Norman, 1971; Omdahl a. oth., 1971). В последующем метаболит IVB был изолирован из кишечника рахитичных цып-

лят, получавших витамин $Д_3$ (Haussler a. oth., 1971). Этот метаболит, образующийся в очень небольших количествах (0,2 МЕ или 0,05 *мкг* на кишечник цыпленка), по своим хроматографическим свойствам являлся более полярным, чем 25-оксихолекальциферол. Метаболит IVB обладал большей активностью и менее длительным латентным периодом в стимуляции кишечного транспорта кальция по сравнению с действием 25-оксихолекальциферола (Myrtle a. oth., 1970; Haussler a. oth., 1971; Myrtle, Norman, 1971). Более того, было выявлено, что 25-оксихолекальциферол является предшественником метаболита IVB, а время появления его в слизистой тонкого кишечника согласуется с продолжительностью латентного периода в его действии на кишечный транспорт кальция (Myrtle a. oth., 1970; Myrtle, Norman, 1971). Эти данные привели к предположению, что витамин $Д_3$ через стадию образования 25-оксихолекальциферола в печени преобразуется в последующем в метаболит IVB, являющийся активной формой витамина в кишечнике.

Kodicek с сотр. после введения рахитичным цыплятам 4-C^{14}-холекальциферола и 1-H^3-холекальциферола показали наличие в ядрах слизистой тонкого кишечника тритий-дефицитного метаболита, обозначенного как пик Р и являющегося хроматографически более полярным, чем сам витамин $Д_3$ или его 25-оксидериват (Lawson a. oth., 1969a, b). Основная часть радиоактивности в ядрах слизистой кишечника была обусловлена именно этим метаболитом, лишенным трития при C_1, а не 25-оксихолекальциферолом, исходя из чего было предположено, что данный метаболит является активной формой витамина в кишечнике. Содержание этого метаболита в слизистой кишечника оказалось очень незначительным (меньше 3 *нг/г* ткани), что затрудняло получение его в количествах, достаточных для проведения классических исследований по выяснению химической структуры или стандартизации биологической активности (Lawson, 1971).

Однако, несмотря на эти трудности, из слизистой тонкого кишечника 450 рахитичных цыплят, получавших витамин $Д_3$, было выделено около 5 *мкг* тритий-дефицитного вещества (Lawson, 1971). Данный метаболит обладал значительно большей биологической активностью в стимуляции кишечного транспорта кальция по сравнению с самим витамином $Д_3$ или с 25-оксихолекальциферолом, причем продолжительность латентного периода в его действии также оказалась более короткой (Kodicek a. oth., 1970). Это соответствовало предположению, что пик Р, так же как и метаболит IVB, представляет собой активную форму витамина в

кишечнике. Однако было показано, что пик Р-метаболит мало активен в повышении уровня сывороточного кальция и в излечивании рахита, исходя из чего можно полагать о малой эффективности данного метаболита в обмене костного минерала. Скорость появления пик Р-метаболита в слизистой кишечника после введения витамина $Д_3$ согласуется с предположением об образовании его из 25-оксихолекальциферола (Lawson a. oth., 1971a).

Это предположение подтверждается тем фактом, что пик Р-метаболит образуется в организме не только после введения витамина $Д_3$, но и после инъецирования 25-оксихолекальциферола. Более того, было точно определено место трансформации молекулы 25-оксихолекальциферола в пик Р-метаболит (Fraser, Kodicek, 1970). При инкубации 25-оксихолекальциферола с двойной меткой in vitro с гомогенатами различных тканей цыплят радиоактивность локализуется в области пика Р только в случае с гомогенатами почек. Образование пик Р-метаболита in vitro требует наличия молекулярного кислорода и Mg^{2+}. Яблочная кислота стимулирует, а окись углерода угнетает данный процесс. Также показано, что двухсторонняя нефрэктомия у крыс приводит к тому, что пик Р-метаболит не обнаруживается ни в слизистой кишечника, ни в плазме. Эти данные убедительно показывают, что пик Р-метаболит образуется из 25-оксихолекальциферола и что, вероятно, единственным местом подобного преобразования являются почки.

В последующем при инкубации [26-C^{14}, 1-H^3]-25-оксихолекальциферола с гомогенатами почек рахитичных цыплят обнаружено соединение, лишенное [H^3] у C_1 и идентичное с метаболитом-пик Р. Это соединение было выделено в чистом виде путем хроматографии на силикагеле и сефадексе LH-20 и идентифицировано по масс-спектру и спектру ультрафиолетовой абсорбции как 1,25-диоксихолекальциферол (1,25-ДОХК) (Lawson a. oth., 1971). 1,25-Диоксихолекальциферол изолировали De Luca с сотр. из пика V (обозначение см. выше) слизистой тонкого кишечника цыплят и идентифицировали с помощью масс-спектрометрии, спектрофотометрии, ультрафиолетовой абсорбции и специфических химических реакций (Holick a. oth., 1971a, b).

Таким образом, метаболиты, обозначенные как IVB (Norman и сотр.), пик Р (Kodicek и сотр.) и пик V (De Luca и сотр.) содержали одно и то же соединение — 1,25-диоксихолекальциферол (Omdahl a. oth., 1971). Образование 1,25-диоксихолекальциферола из 25-оксихолекальциферола происходит не только у птиц, но и у млекопитающих. В частности, 1,25-диоксихолекальциферол обнаружен в сыворотке

крови людей (Mawer a. oth., 1971), в сыворотке, слизистой кишечника, почках и костях крыс (Boyle a. oth., 1971).

Как уже было отмечено, метаболит-пик P, а следовательно, и 1,25-диоксихолекальциферол синтезируется в почках из 25-оксихолекальциферола. В последующем это было подтверждено получением 1,25-диоксихолекальциферола при инкубации 25-оксихолекальциферола с гомогенатом почек рахитичных цыплят (Frolik, De Luca, 1971). Анализ литературных данных показывает, что почки являются, по-видимому, основным, если не единственным органом, ответственным за продукцию 1,25-диоксихолекальциферола.

В исследованиях, проведенных с использованием ингибиторов синтеза белка и нуклеиновых кислот, выявлены новые важные моменты в метаболизировании витамина Д в активные формы. Оказалось, что предварительное введение актиномицина Д или циклогексемида предотвращает превращение 25-оксихолекальциферола в более полярные метаболиты, в том числе и в 1,25-диоксихолекальциферол (Tanaka, De Luca, 1971a; Tanaka a. oth., 1971). Однако процесс трансформации молекулы витамина $Д_3$ в 25-оксихолекальциферол в печени не чувствителен к данным метаболическим ингибиторам. Эти исследования привели к гипотезе, которая предусматривает, что 25-оксихолекальциферол должен инициировать в почке биосинтез ферментов, участвующих в образовании 1,25-диоксихолекальциферола. Возможно, что данный процесс связан с дерепрессией участка генома, ответственного за образование этого фермента (или ферментов).

Скорость образования 1,25-диоксихолекальциферола в организме поддерживается, по-видимому, на определенном уровне. Об этом свидетельствуют данные, что количество его в кишечнике постоянно и равняется приблизительно 13 пМ на цыпленка независимо от величины введенной дозы витамина $Д_3$ (Omdahl a. oth., 1971). Более того, было показано (Boyle a. oth., 1971), что образование 1,25-диоксихолекальциферола находится в зависимости от содержания кальция в рационе. Так, с увеличением его содержания от 0,02 до 2% концентрация 1,25-диоксихолекальциферола в сыворотке, слизистой кишечника, почках и костной ткани крыс падает. Однако подобная взаимосвязь зависит также от состояния Д-витаминного статуса в организме. В частности, у крыс с Д-витаминной недостаточностью подавление образования 1,25-диоксихолекальциферола наступало только в том случае, когда содержание кальция в рационе достигало 3%. Следовательно, можно ожидать, что в регуляции биосинтеза 1,25-диоксихолекальциферола имеет важ-

ное значение наличие ионов кальция. Это предположение согласуется с данными, свидетельствующими, что с уменьшением содержания кальция в рационе возрастает чувствительность организма к витамину Д (если полагать, что 1,25-диоксихолекальциферол является активной формой витамина $Д_3$ в стимуляции транспорта кальция в кишечнике).

1,25-диоксихолекальциферол оказался очень эффективным агентом, стимулирующим всасывание кальция в кишечнике. Он повышает абсорбцию кальция значительно быстрее и в большей степени, чем витамин $Д_3$ или 25-оксихолекальциферол. Так, 1,25-диоксихолекальциферол стимулировал всасывание кальция в тонком кишечнике в 2 (Holick a. oth., 1971a, b; Omdahl a. oth., 1971) или 4 (Norman, 1971) раза эффективнее, чем витамин $Д_3$, и в 2 раза, чем 25-оксихолекальциферол (Norman, 1971).

При изучении распределения (26, 27-H^3)-1,25-диоксихолекальциферола, полученного из (26, 27-H^3)-25-оксихолекальциферола путем инкубации последнего с гомогенатами почек рахитичных цыплят, было показано (Frolik, De Luca, 1971), что значительная часть радиоактивности аккумулируется в слизистой тонкого кишечника. При этом вся радиометка обнаруживалась в составе 1,25-диоксихолекальциферола. Время обнаружения метаболита в слизистой кишечника совпадало со временем стимуляции всасывания кальция в кишечнике. Авторы приходят к заключению, что стимуляции 1,25-диоксихолекальциферолом абсорбции кальция в кишечнике не предшествует превращение его в какие-либо другие метаболиты.

Таким образом, 1,25-диоксихолекальциферол эффективнее и быстрее оказывает действие на абсорбцию кальция в кишечнике по сравнению как с витамином $Д_3$, так и 25-оксихолекальциферолом. Это дает возможность говорить о важном значении данного метаболита в действии витамина Д, поскольку он, по-видимому, является биологически активной формой витамина в кишечнике.

Как известно, актиномицин Д снимает стимулирующее действие витамина Д и 25-оксихолекальциферола на кишечный транспорт кальция. В то же время процесс кишечной абсорбции кальция в ответ на введение 1,25-диоксихолекальциферола оказался не чувствительным к антибиотику (Tanaka a. oth., 1971). Исходя из этих данных можно полагать, что 1,25-диоксихолекальциферол является метаболически активной формой витамина Д, который функционирует путем, не включающим транскрипцию ДНК.

В отличие от выраженной эффективности в стимуляции всасывания кальция в кишечнике, 1,25-диоксихолекальци-

ферол обладал приблизительно в 2 раза меньшей антирахитической активностью, чем 25-оксихолекальциферол, при оценке этой активности по степени кальцификации костной ткани у рахитичных крыс (Omdahl a. oth., 1971). Исходя из этих данных можно было бы ожидать, что данный метаболит не играет важной роли в проявлении действия витамина Д на костную ткань. Однако дальнейшие исследования показали (Tanaka, De Luca, 1971), что действие 1,25-диоксихолекальциферола на мобилизацию кальция из костной ткани проявляется быстрее по сравнению с эффектом идентичной дозы 25-холекальциферола. При изучении распределения радиометки после введения рахитичным цыплятам 1,2-H^3-витамина $Д_3$ было выявлено (Weber a. oth., 1971), что 77% радиоактивности в ядерной фракции костных клеток приходится на долю 1,25-диоксихолекальциферола, в то время как лишь 6 и 9% радиоактивности были обусловлены соответственно 25-оксихолекальциферолом и витамином $Д_3$. Кроме того, предварительное (за 2 *час*) применение актиномицина Д в дозе 0,5 *мкг/г* веса тела блокировало стимулирующее действие 1,25-диоксихолекальциферола и 25-оксихолекальциферола на мобилизацию ионов кальция из костной ткани (Tanaka, De Luca, 1971a). Приведенные данные в сочетании с предполагаемым действием витамина Д на уровне генома могут свидетельствовать о важной роли 1,25-диоксихолекальциферола в проявлении действия витамина Д не только в кишечнике, но и в костной ткани. Дальнейшая экспериментальная оценка этих вопросов представляет несомненный интерес в выяснении механизма действия витамина Д на минеральный обмен в костной ткани.

Обнаружение того факта, что в почке синтезируется биологически активный метаболит витамина Д, согласуется с патогенезом ряда заболеваний, касающихся обмена кальция и фосфора. Например, у некоторых больных с почечной недостаточностью в костной системе развиваются нарушения, характерные для рахита или остеомаляций. Известен даже ряд заболеваний, объединяемых под названием «ренальный рахит», и резистентных к витамину Д рахитоподобных заболеваний, этиология и патогенез которых до сих пор не выяснены. Возможно, в этих случаях изменения в минеральном обмене и метаболизме костной ткани являются следствием неспособности почек синтезировать 1,25-диоксихолекальциферол. Нарушения в действии витамина Д, по-видимому, могут быть обусловлены блокированием метаболизма витамина на стадии образования или 25-оксихолекальциферола или 1,25-диоксихолекальциферола.

Исследования в этом направлении имеют, несомненно, важное значение как в теоретическом, так и в практическом плане, поскольку уже в настоящее время имеются достаточно обоснованные предпосылки для получения и внедрения в медицинскую практику более эффективных и быстродействующих препаратов с Д-витаминной активностью, которые, возможно, будут обладать терапевтическим действием и при заболеваниях, резистентных к самому витамину Д.

Суммируя изложенное, можно сказать, что витамин Д, по-видимому, проявляет свое физиологическое действие не в чистом виде, а в форме биологически активных соединений, образующихся в организме. Биосинтез этих соединений схематически можно представить следующим образом (Lawson, 1971):

$$\text{7-дегидрохолестерин} \xrightarrow[\text{кожа}]{\text{УФ-облучение}} \text{холекальциферол} \xrightarrow[\text{печень}]{\text{25-оксидаза}}$$

$$\longrightarrow \text{25-оксихолекальциферол} \xrightarrow[\text{почки}]{\text{1-оксидаза}} \text{1,25-диоксихолекальциферол} \longrightarrow \text{ткань-мишень}$$

В образовании активного метаболита витамина Д в организме из 7-дегидрохолестерина, как видно из схемы, необходимы три ткани. Кожа выполняет важную роль в превращении провитамина (7-дегидрохолестерина) в холекальциферол, а последний только в печени способен преобразовываться в 25-оксихолекальциферол, который быстро поступает в кровяное русло. Количество 25-оксихолекальциферола, по-видимому, зависит от уровня вводимого в организм холекальциферола. Третьим органом, играющим важное значение в выражении физиологического действия витамина Д, являются почки, которые, очевидно, представляют собой единственный орган, где 25-оксихолекальциферол преобразуется в биологически активный метаболит — 1,25-диоксихолекальциферол. Над продукцией данного соединения, по-видимому, существует специфический контроль, так как 1,25-диоксихолекальциферол обнаруживается в тканях-мишенях лишь в незначительных количествах. Как 25-оксихолекальциферол, так и 1,25-диоксихолекальциферол образуются в небольших количествах только в одном органе и разносятся плазмой к тканям-мишеням, обладают значительной био-

логической активностью, что позволяет причислять их к соединениям ряда гормонов.

Таким образом, витамин Д, синтезируемый в организме или вводимый извне, подвергается различным метаболическим превращениям до проявления физиологического эффекта. К настоящему времени достигнуты значительные успехи в изучении обмена витамина Д. Это в определенной мере было обусловлено получением меченых препаратов витамина Д с высокой удельной активностью, что позволило проводить исследования с применением данного витамина в физиологических дозах, с развитием методов экстракции, выделения и идентификации химической структуры метаболитов витамина Д. Анализ представленных данных позволяет отметить следующие основные моменты в метаболизме витамина Д.

1. Витамин Д синтезируется в организме из соответствующих провитаминов при воздействии ультрафиолетовых лучей. В последние годы показана возможность биосинтеза витамина Д ферментативным путем. Имеются предположения, что витамин Д, синтезируемый в организме, отличается по своей структуре от витамина Д, получаемого путем химического синтеза.

2. Витамин Д, поступающий через рот, всасывается главным образом в тонком кишечнике при непосредственном участии желчных кислот. При этом химическая структура витамина Д не претерпевает существенных изменений.

3. Витамин Д транспортируется в крови в связанной с сывороточными белками форме. Эта связь предохраняет молекулу витамина Д от метаболических деградаций и выполняет важную роль в транспорте его к специфическим рецепторным молекулам органов-мишеней.

4. Выделение витамина Д через желчь с калом представляет основной путь его элиминации. Витамин Д, обладая невысокой скоростью элиминации, может накапливаться в организме и вызывать токсические явления.

5. Витамин Д, введенный в организм в физиологических дозах на фоне его недостаточности, избирательно аккумулируется (преимущественно в виде биологически активных метаболитов) в тканях-мишенях (слизистая тонкого кишечника и костная ткань). В этих тканях содержатся специфические рецепторные молекулы для витамина Д и его метаболитов. Характер субклеточного распределения витамина Д и его обменно-активных форм может свидетельствовать о ядерном уровне действия витамина Д путем инициации процессов транскрипции и трансляции генетической информации. При введении витамина Д в дозах, превышающих

физиологическую потребность в нем, он аккумулируется во многих органах и тканях.

6. Витамин Д, по-видимому, проявляет свое действие после преобразования его молекулы в обменно-активные соединения. В метаболических превращениях витамина Д важную роль играют печень и почки, где синтезируются его обменно-активные формы.

Известно, что между введением витамина Д и проявлением его физиологического эффекта существует латентный период. Исходя из приведенных данных можно полагать, что определенная часть латентного периода в действии витамина обусловлена временем, необходимым для преобразования его молекулы в обменно-активные формы. Однако латентный период, по-видимому, не ограничивается только названным промежутком времени. В частности, в настоящее время имеются экспериментальные данные, позволяющие полагать, что механизм действия витамина Д заключается в инициации транскрипции генетической информации в РНК и последующего образования функциональных белковых молекул. Данный подход к исследованию роли витамина Д представляет несомненный интерес.

Глава III

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА Д НА МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКА И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Наряду с общеизвестным действием витамина Д на минеральный обмен имеется значительный фактический материал, свидетельствующий, что как при рахите, так и при гипервитаминозе Д, в организме возникают изменения в обмене белка и нуклеиновых кислот. Наличие обширного комплекса биохимических и морфологических сдвигов при недостаточном или избыточном поступлении витамина Д также свидетельствует, что данный витамин прямо или косвенно вмешивается во многие виды обмена веществ. Результаты некоторых исследований показывают, что влияние витамина Д на метаболизм макромолекул предшествует его действию на минеральный обмен.

Таким образом, изучение влияния витамина Д на метаболизм белка и нуклеиновых кислот существенно важно как для выяснения механизма действия витамина Д, так и вопросов, касающихся патогенеза рахита и гипервитаминоза Д. Интерес к исследованию влияния витамина Д на обмен белка и нуклеиновых кислот возрос особенно в последние годы, в связи с получением данных, позволяющих полагать, что витамин Д, по аналогии со стероидными гормонами (Сергеев и др., 1971), может быть индуктором, стимулирующим геном, ответственный за биосинтез белковых компонентов системы транспорта кальция.

Взаимодействие витамина Д и актиномицина Д

Одним из важных вопросов в выяснении механизма действия витамина Д является установление сущности латентного периода между временем введения ви-

тамина и началом оказываемого им эффекта. Как одним из возможных объяснений задержки в действии витамина Д явилось предположение, что витамин Д может инициировать некоторые биохимические процессы. В частности, допускалось, что в слизистой кишечника и костной ткани должны синтезироваться ферменты, участвующие в процессах костной мобилизации и абсорбции кальция в кишечнике, а витамин Д может играть важную роль в инициации синтеза этих белковых молекул. В 1964—1965 гг. из ряда лабораторий появились сообщения, что такие ингибиторы синтеза белка и нуклеиновых кислот, как пуромицин и актиномицин Д, при введении их паратиреоидэктомированным крысам ингибируют действие паратиреоидного гормона на содержание кальция в сыворотке крови (Milhaud a. oth., 1964; Rasmussen a. oth., 1964; Tashjian a. oth., 1964; Kunin, Krane, 1965; Tashjian, 1965).

Поскольку действие гормона ингибировалось при подавлении процессов транскрипции и трансляции, логично было предположить, что влияние паратиреоидного гормона на метаболизм кальция связано с биосинтезом каких-то белковых молекул. Однако не менее логично считать, что ингибирующее влияние актиномицина Д и пуромицина на эффект паратиреоидного гормона может быть опосредовано через витамин Д. Правомочность последнего предположения основывается на данных Rasmussen с сотр. (1963) и Harrison (1964), которые показали, что наличие витамина Д для проявления гиперкальцемического действия паратиреоидного гормона обязательно, в то время как витамин Д проявляет свое действие и у паратиреоидэктомированных животных. Таким образом, к названному времени создалась определенная предпосылка для изучения влияния витамина Д на метаболизм белка и нуклеиновых кислот и возможной роли этих процессов в механизме действия витамина Д на минеральный обмен.

Впервые Eisenstein и Passavoy (1964) в опытах с применением актиномицина Д, являющегося специфическим ингибитором ДНК-зависимого синтеза информационной РНК (Reich a. oth., 1961), показали, что предварительное введение данного антибиотика блокирует гиперкальцемический эффект больших доз витамина Д. В последующем появились убедительные данные, что актиномицин Д полностью предотвращает повышение уровня сывороточного кальция, повышение транспорта кальция в вывернутом кишечном мешке in vitro и стимуляцию абсорбции кальция в кишечнике in vivo, вызванные витамином Д у рахитичных крыс и цыплят (Norman, 1965, 1966; Zull a. oth., 1965, 1966; Bosman, Chen, 1966). Примечательно, что актиномицин Д ингибирует дей-

ствие витамина Д, даже примененного в дозе, превышающей физиологическую потребность в нем в несколько тысяч раз. Ингибирующий эффект актиномицина Д на абсорбцию кальция в кишечнике зависит от дозы и сроков введения как антибиотика, так и витамина Д (табл. 15).

Таблица 15

Влияние актиномицина Д на всасывание кальция в кишечнике, стимулируемое витамином Д (Norman, 1965)

Доза витамина, МЕ	Доза актиномицина, *мг*/100 *г*	Концентрация Ca^{45}, *имп/мин/мл*, через 30 *мин* (M±m)	Концентрация Ca^{45}, *имп/мин/мл*, через 60 *мин* (M±m)
Эксперимент А			
0	0	840±230	1200±240
100	10,0	780±320	1280±360
100	1,0	1290±500	1500±430
100	0	2440±430	2750±370
Эксперимент Б			
0	0	350±70	600±150
20000	10,0	690±420	750±250
20000	0	1770±390	2100±490
Эксперимент В			
4000	0	2310±320	2920±290
4000 (за 24 *час* до введения актиномицина Д)	10,0	2500±450	3100±150

Примечание. Транспорт Ca^{45} изучался путем измерения радиоактивности сыворотки крови. Ca^{45} вводили перорально через 24 *час* после введения витамина Д. В экспериментах А и Б актиномицин Д вводили за 2 *час* до применения витамина Д.

Нужно отметить, что актиномицин Д оказывал влияние на проявление физиологического эффекта всех исследованных препаратов витаминов группы Д: холекальциферола, эргокальциферола, дигидротахистерина$_2$ и дигидротахистерина$_3$. Это в определенной степени может свидетельствовать об идентичности механизма действия витаминов группы Д.

Актиномицин Д не только ингибирует действие витамина Д, но способен также вызывать симптомы Д-витаминной

недостаточности. У цыплят, выздоровевших от рахита после лечения витамином $Д_3$, вновь появились симптомы Д-витаминной недостаточности уже через 48 *час* после введения антибиотика (Norman, 1966). Возобновление заболевания у подопытных цыплят невозможно было объяснить недостаточностью витамина Д, поскольку они накануне применения актиномицина Д получали 20 000 МЕ холекальциферола. Одним из возможных объяснений данного явления может быть предположение, что в названный промежуток времени могут исчезнуть короткоживущие белки и ферменты, которые принимают участие в метаболизме кальция и были синтезированы раньше в условиях достаточного снабжения витамином Д.

Рахитогенное действие актиномицина Д было недавно показано и в опытах на интактных крысах (Любошиц, 1970). У крыс, получавших актиномицин Д в дозе 1 *мг/кг*, независимо от дозы вводимого витамина развивалась классическая рентгенологически выраженная картина рахита, идентичная картине рахита у крыс, содержавшихся на рахитогенной диете. Применявшиеся при этом дозы витамина Д превышали физиологическую потребность в нем в 20—400 раз.

Актиномицин Д вызывает гипокальцемию у нормальных, нефроэктомированных, адреналэктомированных и тиреоидэктомированных (с функционирующим трансплантантом паращитовидной железы) крыс (Khoo, Kowalewski, 1965). Между тем результаты исследований Bosman и Chen (1966) свидетельствуют, что действие витамина Д на минеральный обмен в костной ткани не чувствительно к актиномицину Д. Очевидно, рахитогенный эффект актиномицина Д обусловлен ингибирующим действием последнего на стимулируемую витамином Д абсорбцию кальция в кишечнике.

Представляет интерес, что торможение действия витамина Д вызывает не только актиномицин Д, но и такие соединения, как пуромицин и 5-фтор-оротовая кислота (Zull a. oth., 1966). Эти соединения, как известно, воздействуют на генетические механизмы клеток, регулирующие образование белков и ферментов, и могут прерывать систему биосинтеза белка на различных звеньях. В связи с этим названные соединения широко применяются для тестирования участия различных препаратов в регуляции системы биосинтеза белка. Поскольку действие витамина Д тормозилось этими метаболическими ингибиторами, можно было ожидать, что появление эффекта витамина Д связано с биосинтезом определенных белковых молекул.

Рассмотрим возможные варианты участия актиномицина Д в проявлении физиологического эффекта витамина Д на метаболизм кальция.

1. Актиномицин Д, являясь токсичным соединением, может вызывать различные изменения типа некроза или гибели клеток и приводить к изменению проницаемости биологических мембран для кальция. Таким образом, эта возможность предусматривает прямое участие актиномицина Д в метаболизме кальция.

2. Актиномицин Д может изменять метаболизм витамина Д путем блокады синтеза белков и ферментов, принимающих участие или в процессе абсорбции витамина, или в образовании его биологически активных метаболитов, или в циторецепции витамина.

3. Более вероятной возможностью может быть предположение, что витамин Д является регулятором ДНК-зависимого синтеза РНК и последующего образования специфического белка, являющегося необходимым компонентом системы транспорта кальция, а актиномицин Д блокирует эти биохимические процессы.

4. Не исключено одновременное сочетание названных выше факторов.

Подробными исследованиями было показано, что актиномицин Д, вводимый в дозах 0,2—1,0 *мкг/г* веса тела, не нарушает исходный уровень метаболизма кальция и фосфора у рахитичных крыс и цыплят (Bosman, Chen, 1966; Zull a. oth., 1966a). При этом было выявлено, что у рахитичных животных имеется определенный критический уровень абсорбции кальция в кишечнике, мобилизации костного минерала и концентрации сывороточного кальция, который не ингибируется актиномицином Д. Повышенный уровень абсорбции кальция в кишечнике, вызванный введением витамина $Д_3$ или дигидротахистерина$_2$ рахитичным животным, снижается до исходного уровня после введения актиномицина Д.

Исходя из этих данных нужно подчеркнуть важность моделирования истинной Д-витаминной недостаточности в исследованиях, направленных на выяснение роли актиномицина Д в системе транспорта кальция. Возможно, что заключение H. E. Harrison и H. C. Harrison (1966) о воздействии актиномицина Д на транспортную систему кальция как таковую, а не на эффект витамина Д исходит из экспериментальных условий (авторы отмечают, что в опытах использовались крысы, содержавшиеся на лишенной витамина Д диете лишь в течение 2—3 недель, причем концентрация сывороточного фосфора оставалась нормальной, а гисто-

логические изменения в тканях, характерные для рахита, отсутствовали).

Было показано также, что актиномицин Д в использованных дозах не вызывает каких-либо заметных деструктивных изменений в слизистой кишечника (Zull a. oth., 1966a). Следовательно, данный антибиотик может быть пригодным для специфического блокирования физиологического эффекта витамина Д в исследованиях, направленных на выяснение механизма действия последнего на транскрипцию генетической информации.

Актиномицин Д эффективно блокирует действие витамина Д независимо от того, вводится ли последний перорально или парентерально (Norman, 1966a). На основании этих данных высказывается предположение, что ингибирующее влияние антибиотика не связано с его воздействием на процессы абсорбции витамина Д в кишечнике.

Актиномицин Д не оказывает заметного влияния на тканевое распределение радиометки после введения рахитичным животным H^3-витамина $Д_3$ (Zull a. oth., 1966a). Однако эти данные не дают нам никаких сведений о влиянии антибиотика на уровне образования метаболитов витамина Д и распределения последних в тканях и субклеточных органеллах.

Совсем недавно было обнаружено, что процесс трансформации молекулы витамина $Д_3$ в 25-оксихолекальциферол нечувствителен к актиномицину Д, однако последний предотвращает превращение 25-оксихолекальциферола в более полярные метаболиты, в том числе и в 1,25-диоксихолекальциферол (Tanaka, De Luca, 1971a; Tanaka a. oth., 1971). Кроме того, актиномицин Д снимает стимулирующее действие 25-оксихолекальциферола на кишечный транспорт кальция, в то время как процесс абсорбции кальция в ответ на введение 1,25-диоксихолекальциферола оказался нечувствительным к антибиотику. Возможно, что стадия «чувствительности» действия витамина Д к актиномицину Д представлена на уровне названных метаболических превращений. В частности, можно предполагать, что 25-оксихолекальциферол каким-то образом инициирует процессы транскрипции и трансляции, приводящие к биосинтезу белка, участвующего в ферментативных превращениях 25-оксихолекальциферола в 1,25-диоксихолекальциферол. Однако эти данные не отрицают наличия других, еще не выявленных аспектов взаимодействия витамина Д с актиномицином Д. Подобное предположение основывается, во-первых, на том факте, что еще не выяснено, является ли 1,25-диоксихолекальциферол основным биологически активным метаболи-

том, ответственным за проявление физиологического эффекта витамина Д. Имеется также ряд других метаболитов витамина Д, чувствительность которых к антибиотику еще не изучена. Во-вторых, накоплен фактический материал, свидетельствующий в пользу предположения, что физиологический эффект витамина Д связан с биосинтезом белка, являющегося компонентом системы транспорта кальция.

Представляет интерес, что действие витамина Д блокируется актиномицином Д при условии введения последнего или одновременно, или за 1—2 *час* до применения витамина Д (Norman, 1966). При введении актиномицина Д через 5—8 *час* после применения витамина Д ингибирующий эффект антибиотика на опосредованный витамином Д транспорт кальция не проявляется. Эти данные дают возможность полагать, что актиномицин Д ингибирует одну из ранних стадий в цепи биохимических реакций, инициируемых витамином Д. Поскольку актиномицин Д, с одной стороны, тормозит действие витамина Д на транспорт кальция в кишечнике, с другой стороны, данный антибиотик блокирует биосинтез белка на уровне образования информационной РНК, представляло интерес исследовать влияние витамина Д на метаболизм нуклеиновых кислот и белка в кишечнике и выявить возможную взаимосвязь между данными процессами и эффектом витамина на кальциевый обмен.

Регуляция витамином Д обмена нуклеиновых кислот

Изучение данного вопроса начато относительно недавно, вслед за плодотворными исследованиями о влиянии ингибиторов синтеза белка и нуклеиновых кислот на проявление физиологического эффекта витамина Д, и направлено главным образом на выяснение механизма действия витамина Д в клетке. Тот факт, что актиномицин Д (ингибитор транскрипции генетической информации) снимает физиологический эффект витамина Д, указывает на возможность последнего осуществлять свое действие путем влияния на генетический аппарат клеток. Изучение механизма подобного действия витамина Д в деталях является довольно сложным и порой дискутабельным. Однако к настоящему времени в этой области получены интересные сведения, проясняющие механизм действия витамина Д в отношении уровня участия его в биохимических процессах.

В опытах на крысах, содержавшихся в течение 3—4 недель на диете без витамина Д, было установлено, что внутрибрюшинное введение 2000 МЕ холекальциферола вызы-

вает трехкратное увеличение скорости включения H^3-оротовой кислоты в ядерную РНК слизистой тонкого кишечника (Stohs a. oth., 1967) (табл. 16). Максимальный эффект наблюдается при этом через 3 *час* после применения витамина. Уменьшение дозы витамина (до 10 МЕ) приводит к сниже-

Таблица 16

Влияние витамина $Д_3$ на скорость инкорпорации H^3-оротовой кислоты в ядерную РНК слизистой тонкого кишечника рахитичных крыс (Stohs a. oth., 1967)

Доза витамина, МЕ	Время, *час*	Удельная активность H^3-РНК, *имп/мин*/ОП ($M \pm m$)	
		Витамин Д	Контроль
2000	2,0	258±8(4)	166±13(4)
2000	3,0	376±58(10)	134±22(10)
2000	5,0	323±23(8)	178±21(8)
2000	8,0	207±83(8)	233±99(8)
10	5,0	69±2(4)	70±10(4)
10	8,0	119±8(4)	77±6(4)
10	12,0	97±3(4)	73±2(4)

Примечание. Все животные получали 50 *микрокюри* H^3-оротовой кислоты за 1 *час* до забоя. Определения проводили через указанное время (*час*) после введения соответствующей дозы витамина Д. Числа в скобках указывают количество животных.

нию эффекта, но латентный период в действии холекальциферола на биосинтез РНК удлиняется до 8 *час*. Нужно отметить, что в данном эксперименте исследовался биосинтез быстрометящейся РНК. Отсутствие заметных сдвигов в скорости инкорпорации меченого предшественника в микросомальную, митохондриальную и цитоплазматическую РНК указывает на то, что влияние витамина Д на биосинтез быстрометящейся РНК в пределах слизистой тонкого кишечника строго специфично и проявляется лишь в случае с ядерной РНК. Неспособность холекальциферола вызывать заметные изменения в скорости включения H^3-оротовой кислоты в РНК печени и почки свидетельствует о наличии тканевой специфичности в действии витамина Д на метаболизм РНК.

Стимуляция витамином Д биосинтеза РНК слизистой тонкого кишечника наблюдалась и в опытах на рахитичных цыплятах (Norman, 1966b; Lawson a. oth., 1969a), хотя в данном случае латентный период в действии витамина Д

оказался значительно короче и составлял лишь 10—30 *мин*. Возможно, что укорочение латентного периода связано с применением большей дозы витамина (авторы применяли 5000 МЕ холекальциферола). Существенно важным моментом является то, что как у крыс (Zull a. oth., 1966a), так и у мышей (Norman, 1966b) стимулированный витамином Д биосинтез РНК в слизистой кишечника полностью блокируется предварительным введением актиномицина Д. Нужно отметить, однако, что у рахитичных цыплят витамин $Д_2$ в отличие от холекальциферола или не оказывал, или оказывал лишь незначительное влияние на биосинтез РНК в слизистой тонкого кишечника (Norman, 1966b). Очевидно, это является отражением того, что биологическая активность холекальциферола для цыплят превышает активность эргокальциферола приблизительно в 10 раз. В связи с этим представлялось весьма важным исследовать влияние витамина $Д_2$ на метаболизм РНК в слизистой кишечника крыс, поскольку известно, что биологическая активность витаминов $Д_2$ и $Д_3$ для крыс равнозначна.

Учитывая эти данные, мы исследовали влияние витамина $Д_2$ на скорость включения неорганического ортофосфата натрия, меченного P^{32}, в ядерную РНК слизистой тонкого кишечника интактных крыс. При выборе препаратов и экспериментальных условий мы руководствовались следующими соображениями.

Во-первых, для более детального суждения о воздействии какого-либо препарата на биосинтез макромолекул необходимо изучение данного процесса с применением возможно большего числа соответствующих меченых предшественников. В изложенных выше данных о характере биосинтеза РНК судили по скорости включения H^3-оротовой кислоты (Stohs a. oth., 1967; Lawson a. oth., 1969a) или H^3-уридина (Norman, 1966b). Поэтому нами выбран неорганический ортофосфат натрия, меченный P^{32}: он широко апробирован и применяется во многих лабораториях при изучении биосинтеза быстрометящейся РНК.

Во-вторых, не было данных о влиянии витамина Д на метаболизм РНК слизистой кишечника у интактных животных. Между тем значимость исследования данных вопросов для выяснения взаимозависимости синтетических процессов в клетке и физиологического эффекта витамина Д очевидна, поскольку влияние витамина Д на минеральный обмен проявляется как у рахитичных, так и у интактных животных.

Нами выявлено стимулирующее влияние витамина $Д_2$ на скорость инкорпорации меченого ортофосфата натрия в ядерную РНК слизистой тонкого кишечника интактных

крыс (табл. 17). При этом с увеличением дозы препарата возрастает его стимулирующее влияние на биосинтез РНК и укорачивается промежуток времени от введения витамина до начала повышения скорости включения радиометки в ядерную РНК. Однако подобный дозозависимый эффект имеет, по-видимому, определенный предел. Об этом свидетельствует отсутствие различий в величинах максимальных эффектов, вызванных введением витамина в дозах 30 000 и

Таблица 17

Влияние витамина Д$_2$ на скорость инкорпорации P^{32} в ядерную РНК слизистой тонкого кишечника интактных крыс ($M \pm m$)

Доза витамина, МЕ	Включение P^{32} в РНК, % к контролю, после введения витамина через					
	2 час	*4 час*	*8 час*	*12 час*	*24 час*	*48 час*
100	$98 \pm 6,9$	$95 \pm 8,1$	$97 \pm 2,3$	$106 \pm 3,9$	$102 \pm 3,2$	$93 \pm 2,8$
1000	$96 \pm 7,2$	$98 \pm 9,3$	$108 \pm 7,9$	$119 \pm 4,1$ $P < 0,05$	$100 \pm 1,9$	$93 \pm 3,9$
15000	$100 \pm 3,8$	$108 \pm 6,2$	$136 \pm 6,3$ $P < 0,01$	$118 \pm 4,3$ $P < 0,05$	$89 \pm 9,3$	$92 \pm 5,2$
30000	$95 \pm 12,0$	$132 \pm 5,5$ $P < 0,01$	$144 \pm 5,1$ $P < 0,001$	$120 \pm 3,8$ $P < 0,02$	$106 \pm 3,8$	$97 \pm 4,9$
45000	$103 \pm 11,1$	$143 \pm 4,9$ $P < 0,001$	$121 \pm 4,2$ $P < 0,02$	$108 \pm 7,9$	$110 \pm 6,9$	$96 \pm 9,1$

Примечание. Абсолютные значения включения P^{32} в ядерную РНК контрольных животных приняты за 100%. Каждое значение представляет среднюю величину 4—8 определений. Р дано только для статистически значимых изменений ($P < 0,05$).

45 000 МЕ. Нужно отметить, что латентный период действия витамина Д$_2$ на биосинтез РНК слизистой кишечника у интактных крыс оказался продолжительнее, а величина эффекта значительно меньше, чем при применении витамина на рахитичных животных. Это, по-видимому, можно объяснить тем, что у интактных животных, заранее обеспеченных определенным количеством витамина Д, последний поддерживает скорость биосинтеза РНК на более высоком уровне, чем у рахитичных животных. В связи с этим дополнительное введение витамина вызывает у них меньшую ответную реакцию.

Таким образом, можно говорить об идентичности действия витамина Д на метаболизм быстрометящейся ядерной РНК слизистой тонкого кишечника у рахитичных и интактных животных.

В наших исследованиях однократное введение витамина Д$_2$ в дозах 1000—45 000 МЕ не вызывало заметных сдвигов

в скорости включения P^{32} в высокополимерную РНК печени и почки интактных крыс. Следовательно, и в данном случае наблюдается тканевая избирательность в действии витамина Д: стимуляцию биосинтеза РНК витамин Д вызывает в ткани, являющейся для него мишенью.

Нами исследовался метаболизм ядерной РНК слизистой тонкого кишечника при $Д_2$-витаминной интоксикации, вызванной длительным (в течение 5—20 дней) введением интактным крысам масляного раствора витамина $Д_2$ в суточной дозе 1000—45 000 МЕ (Тажибаев, 1972б). При этом наряду

Таблица 18

Включение P^{32} в ядерную РНК слизистой тонкого кишечника крыс после длительного введения витамина $Д_2$ в высоких дозах ($M \pm m$)

Суточная доза витамина, МЕ/100 *г*	Включение P^{32} в РНК, % к контролю, после введения витамина в течение			
	5 дней	10 дней	15 дней	20 дней
1000	$107 \pm 6,7$	$105 \pm 2,3$	$109 \pm 4,9$	$103 \pm 2,1$
15000	$132 \pm 5,2$	$121 \pm 5,7$	$118 \pm 7,7$	$112 \pm 7,2$
	$P < 0,01$	$P < 0,05$		
30000	$148 \pm 4,3$	$151 \pm 5,3$	$129 \pm 6,1$	$119 \pm 4,8$
	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,02$	$P < 0,05$
45000	$155 \pm 4,9$	$142 \pm 3,8$	$125 \pm 3,9$	$120 \pm 5,1$
	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,01$	$P < 0,05$

Примечание. Забой животных проводили через сутки после последнего введения витамина $Д_2$. Абсолютные значения включения P^{32} в ядерную РНК контрольных животных приняты за 100%. Каждое значение представляет среднюю величину 4—8 определений. P дано только для статистически значимых изменений ($P < 0,05$).

с выраженными признаками Д-гипервитаминоза (клинические признаки, увеличение веса почек и надпочечников, повышение концентрации сывороточного кальция и др.) наблюдалось повышение скорости биосинтеза ядерной РНК слизистой тонкого кишечника (табл. 18). Изменения оказались пропорциональными дозе введенного препарата. Наибольшая стимуляция включения метки в РНК наблюдалась в первые 5—10 дней введения витамина $Д_2$, после чего повышение скорости биосинтеза РНК было менее выражено. Нужно отметить, что длительное введение витамина $Д_2$ в суточной дозе 1000 МЕ/100 *г* не привело к развитию выраженных признаков Д-гипервитаминоза и не вызвало статистически достоверных изменений в биосинтезе РНК слизистой

кишечника, хотя удельная радиоактивность РНК при этом оставалась на более высоком уровне по отношению к контролю.

Таким образом, результаты изложенных исследований свидетельствуют о наличии определенной взаимосвязи между физиологическим эффектом витамина Д и участием его в процессах регуляции метаболизма РНК в слизистой тонкого кишечника. Взаимосвязь названных процессов определяется по многим признакам.

Во-первых, витамин Д селективно аккумулируется в ядрах слизистой тонкого кишечника, являющейся для него мишенью. Влияние витамина Д на метаболизм РНК также носит избирательный характер и проявляется в стимуляции биосинтеза ядерной РНК слизистой кишечника. Это может свидетельствовать о ядерном уровне действия витамина Д путем участия в регуляции синтетических процессов в клетке.

Во-вторых, обратный характер зависимости продолжительности латентного периода действия витамина Д на абсорбцию кальция в кишечнике от дозы применяемого витамина проявляется и в случае оценки влияния последнего на биосинтез РНК в кишечнике. Другими словами, длительность латентного периода действия витамина Д как на абсорбцию кальция, так и на обмен РНК в слизистой кишечника имеет обратную зависимость от дозы применяемого витамина. Время стимуляции витамином Д биосинтеза РНК находится при этом в пределах латентного периода действия витамина на обмен кальция.

Следовательно, стимуляция витамином Д биосинтеза макромолекул предшествует его физиологическому эффекту. Возможно, что часть латентного периода в проявлении физиологического эффекта витамина Д обусловлена временем, необходимым для стимулируемых витамином Д синтетических процессов, приводящих в конечном счете к образованию компонентов системы транспорта кальция. Тот факт, что различия в биологической активности препаратов из витаминов группы Д для различных видов животных коррелируют с их эффективностью стимулировать биосинтез РНК, может также служить косвенным подтверждением о наличии тесной взаимосвязи между влиянием витамина на биосинтез макромолекул и обмен кальция. Наконец, стимулируемый витамином Д биосинтез РНК в слизистой тонкого кишечника так же, как и физиологический эффект витамина Д, полностью блокируется предварительным введением актиномицина Д. Поскольку последний является специфическим ингибитором ДНК-зависимого синтеза РНК,

логично полагать, что блокирование биосинтеза макромолекул обусловливает торможение эффекта витамина Д.

Недавно стало известно, что 25-оксихолекальциферол (метаболит витамина $Д_3$, образующийся в печени) так же, как и витамин $Д_3$, обладает стимулирующим действием на инкорпорацию меченых предшественников в ядерную РНК слизистой тонкого кишечника рахитичных крыс (Cousins a. oth., 1970b) (табл. 19). Однако при этом имеется существенная разница в продолжительности латентного периода между введением препарата и проявлением его действия на скорость биосинтеза РНК. Поскольку введенный 25-оксихолекальциферол минует механизм активации в печени, реакция в виде синтеза РНК при его применении появляется быстрее, чем при введении идентичной дозы витамина $Д_3$.

Таблица 19

Влияние 25-оксихолекальциферола на скорость инкорпорации H^3-оротовой кислоты в ядерную РНК слизистой тонкого кишечника (Cousins a. oth., 1970b)

Эксперимент	Время, *час*	Удельная активность H^3-РНК, *имп/мин*/ОП (M±m)	
		25-ОН-витамин $Д_3$	Контроль
1	0,5	149±32	150±45
2	1,0	157±30	119±28
3	2,0	242±17	140±4
4	4,0	244±11	204±16

Примечание. Витамин Д-дефицитные крысы получали внутривенно 10 МЕ (0,25 *мкг*) 25-оксихолекальциферола и забивались через 0,5, 1, 2 и 4 *час*. За 30 *мин* до забоя каждой крысе вводили внутривенно 50 *микрокюри* 5-H^3-оротовой кислоты.

Известно (Blunt a. oth., 1968b), что 25-оксихолекальциферол, введенный внутривенно, инициирует транспорт кальция в кишечнике через 2—3 *час* после инъекции, в то время как эквивалентная доза витамина $Д_3$ требует для полного ответа 8—10 *час*. Стимуляция же биосинтеза РНК достигает максимума через 2 *час* после введения 10 МЕ 25-оксихолекальциферола, что согласуется со временем стимуляции им транспорта кальция в кишечнике. По-видимому, за 2—3-часовой промежуток времени после введения 25-оксихолекальциферола должны синтезироваться витамин Д-зависимые компоненты системы транспорта кальция.

Таким образом, 25-оксихолекальциферол является биологически активным метаболитом витамина $Д_3$ не только в отношении регуляции транспорта кальция в кишечнике и резорбции костного минерала, но и в отношении стимуляции биосинтеза РНК в слизистой тонкого кишечника. Очевидно, при этом активна не сама молекула витамина, а его биологически активный метаболит (или метаболиты). Возможно, таким метаболитом является 25-оксиформа витамина Д. Од-

нако еще не получено окончательного ответа на данный вопрос, поскольку известно, что 25-оксихолекальциферол и 25-оксиэргокальциферол преобразуются в организме в полярные метаболиты. Некоторые из них (1,25-диоксихолекальциферол, 21,25-диоксихолекальциферол и 25,26-диоксихолекальциферол) уже идентифицированы, но, к сожалению, еще не исследовано их влияние на метаболизм нуклеиновых кислот.

Если в настоящее время сам процесс стимуляции биосинтеза РНК в слизистой кишечника после введения животным витамина Д уже не вызывает никаких сомнений, то исследования, направленные на выяснение механизма подобного взаимодействия витамина с генетическим аппаратом клеток, еще весьма немногочисленны. Не ясна еще судьба ядерной РНК, синтезированной в ответ на введение витамина Д, поскольку известно, что основная часть ядерной РНК не покидает пределы ядра (Harris, 1968). Поскольку витамин Д не изменяет общее содержание РНК в слизистой кишечника (Lawson a. oth., 1969a), то можно думать о повышенном обмене РНК в ядрах слизистой тонкого кишечника под влиянием витамина Д. Не ясно, почему у животных с Д-витаминной недостаточностью введение витамина $Д_2$ приводит к 2—3-кратному увеличению скорости биосинтеза РНК в слизистой тонкого кишечника. Данный эффект значительно превосходит ожидаемый, если предполагать, что витамин Д ответствен за биосинтез одного или нескольких белковых компонентов системы транспорта кальция.

Интересные данные получили Hallick и De Luca (1969) при исследовании влияния витамина Д на матричную активность хроматина слизистой тонкого кишечника. Авторы инкубировали хроматин слизистой тонкого кишечника рахитичных крыс, которым за 2—4 *час* до забоя вводили 2000 МЕ витамина $Д_3$, с 8-C^{14}-аденозинтрифосфатом и остальными немеченными нуклеозидтрифосфатами в присутствии очищенной ДНК-зависимой РНК-полимеразы E. Coli. Введение витамина $Д_3$ значительно увеличивало скорость включения метки в РНК, причем наибольшая стимуляция синтеза РНК (в 1,3—2,8 раза) наблюдалась через 3 *час* после введения витамина Д. Эти данные полностью согласуются с результатами исследований по влиянию витамина Д на биосинтез РНК и служат еще одним подтверждением, что витамин Д функционирует путем инициации транскрипции ДНК в информационную РНК, кодирующую синтез специфических функциональных белков.

Попытки локализовать точку приложения в действии витамина Д на процессы транскрипции генетического мате-

риала остаются пока безуспешными. В частности, было показано, что стимулирующий эффект витамина Д на биосинтез РНК в слизистой кишечника не обусловлен влиянием витамина на активность как Mg^{2+}-стимулируемой, так и Mn^{2+}-стимулируемой ДНК-зависимой РНК-полимеразы (Lawson a. oth., 1969a).

Поскольку витамин Д регулирует процессы биосинтеза РНК в слизистой тонкого кишечника, естественно ожидать появления некоторых сдвигов и в физико-химических свойствах нуклеиновых кислот и/или нуклеопротеидов под влиянием витамина Д.

Нами изучено влияние витамина $Д_2$ в условиях in vivo и in vitro на стабильность и конформационные свойства ДНК, ДНП и РНК слизистой тонкого кишечника интактных крыс. Влияние витамина Д на вторичную структуру и стабильность нуклеиновых кислот исследовали методом тепловой денатурации. Данный метод является чувствительным при оценке степени разделения нитей нативной спиральной молекулы ДНК под действием различных химических агентов. Основу денатурации, как известно, составляет превращение двунитчатой спирали ДНК в однонитчатые клубки, проходящее через стадию расплетания спирали. Критерием денатурации служит температура структурного перехода или как ее часто называют — температура «плавления» ($T_{пл}$), соответствующая равновесию, при котором 50% всех молекул находятся в форме двунитчатых спиралей, а 50% — в форме клубков. Оптический метод исследования структурного перехода основан на изменении спектра поглощения света при 260 и 280 *нм* в процессе перехода спираль⟶клубок. Причем больший вклад в поглощение ДНК при 260 *нм* дают АТ пары, а при 280 *нм*—ГЦ пары макромолекулы. Это дает возможность сделать дифференциальную оценку степени денатурации АТ и ГЦ пар оснований ДНК по методу Фельзенфельда — Сандина (Felsenfeld, Sandine, 1962).

Изменения третичной структуры нуклеиновых кислот под влиянием витамина $Д_2$ исследовались нами методом вискозиметрии. Данный метод позволяет судить о конформации биополимеров в растворе и определить их характеристическую вязкость. Последняя, по данным вискозиметрии, является одним из важных параметров молекул нуклеиновых кислот, по которому можно судить о размерах, форме, жесткости и нативности препаратов макромолекул. Вязкость характеризует гидродинамические свойства и асимметрию молекул и поэтому ряд сдвигов в полимере, в результате которых происходит изменение формы без умень-

шения молекулярного веса, также может приводить к изменению вязкости. Метод вискозиметрии широко применяется для определения молекулярного веса нуклеиновых кислот, изучения их макромолекулярной структуры в процессе денатурации и ренатурации (Marmur a. oth., 1963), а также для выяснения механизмов действия различных физико-химических агентов на молекулы нуклеиновых кислот (Доти, 1961; Дэвидсон, 1968).

В серии опытов in vitro производили инкубацию препаратов ДНК, ДНП и РНК слизистой тонкого кишечника интактных крыс с витамином $Д_2$ при температуре +37° в течение 0,5 и 12 *час*. Реакционная смесь состояла из растворов нуклеиновых кислот (ДНК и ДНП в концентрации 0,002%, а РНК — 0,05%) и витамина $Д_2$ (в концентрации 1×10^{-5}M).

Растворителем для ДНП служил 0,7 M NaCl, для ДНК — стандартный солевой раствор (0,15 M NaCl + 0,015 M цитрат натрия) и слабый солевой раствор (0,015 M NaCl + +0,0015 M цитрат натрия), для РНК — стандартный солевой раствор. Хотя витамин $Д_2$ практически нерастворим в воде, при смешивании его спиртового раствора с водой образуется стабильная мелкодисперсная система, имеющая вид слабо опалесцирующего раствора. Для приготовления таких дисперсий 0,01 *мл* раствора витамина $Д_2$ в свежеперегнанном этаноле (10 *мг/мл*) разводили в 23 *мл* соответствующих растворителей для ДНП, ДНК и РНК.

В серии опытов in vivo производили определение физико-химических параметров ДНК, ДНП и РНК слизистой тонкого кишечника крыс, которые через желудочный зонд получали однократную (45 000 МЕ за 4 *час* до забоя) или многократную (по 45 000 МЕ в течение 5 дней) дозу масляного раствора витамина $Д_2$. Определения производили в тех же растворителях, которые применялись в серии опытов in vitro, но без добавления витамина $Д_2$.

Результаты раздельной оценки степени денатурации АТ и ГЦ пар ДНК слизистой тонкого кишечника крыс под влиянием витамина $Д_2$ в зависимости от различных условий представлены в таблице 20.

Из таблицы видно, что инкубация витамина $Д_2$ с ДНК интактных крыс в слабом солевом растворе оказывает некоторое стабилизирующее действие на АТ пары ДНК, но не вызывает изменений в температуре плавления ГЦ пар. При этом влияние витамина на температуру плавления АТ пар возрастает с увеличением времени предварительной инкубации в водной среде.

При однократном введении витамина $Д_2$ в условиях in vivo наблюдались менее выраженные сдвиги в стабильности ДНК, что выражалось в повышении температуры плавления АТ пар лишь в пределах 1°. Температура плавления ГЦ пар при этом оставалась постоянной. Однако при хроническом

Таблица 20

Влияние витамина $Д_2$ на температуру денатурации АТ и ГЦ пар оснований ДНК слизистой тонкого кишечника крыс в зависимости от присутствия витамина в инкубационной среде или введения его в условиях in vivo

Препарат ДНК	Концентрация витамина (М)	Время инкубации, *час*	$T_{пл}$, °С		$\Sigma T_{пл}$, °С
			АТ пар	ГЦ пар	
1	—	—	66,0	68,0	2,0
1	1×10^{-5} (М)	0,5	68,0	68,0	0
1	1×10^{-5} (М)	12,0	69,0	68,0	1,0
2	—	—	67,0	68,0	1,0
3	—	—	66,0	68,0	2,0

Примечание. При инкубации в отсутствии витамина $Д_2$ $T_{пл}$ оснований ДНК не менялась. 1 — ДНК интактных крыс, 2 — ДНК крыс, получавших однократную дозу витамина $Д_2$ (45 000 МЕ за 4 *час* до забоя), 3 — ДНК крыс с Д-гипервитаминозом (по 45 000 МЕ в течение 5 дней).

введении витамина $Д_2$ не было обнаружено изменений в стабильности ДНК слизистой кишечника. Не выявлено также каких-либо заметных сдвигов в денатурации как АТ, так и ГЦ пар ДНП слизистой кишечника во всех исследованных группах.

Небольшие изменения температуры плавления ДНК интактных крыс в водной среде в присутствии витамина Д, по-видимому, обусловлены образованием слабых комплексов между ДНК и витамином. На основании результатов наших исследований трудно судить о характере подобного взаимодействия. Однако, исходя из данных, что стероидные гормоны, родственные по своей химической структуре с витамином Д, образуют слабые комплексы с основаниями ДНК (Сергеев и др., 1971а, 1972; Осняч, 1971), можно предположить о возможности образования подобных по прочности комплексов и в случае с витамином Д. Возможно также, что под влиянием витамина Д, как и в случае со стероидными гормонами, могут возникать локально денатурированные участки ДНК с образованием свободных азотистых оснований, с которыми затем взаимодействует витамин Д.

Обнаружение лишь незначительных сдвигов (в пределах 1°) в температуре плавления ДНК слизистой тонкого кишечника крыс, получавших однократную дозу витамина, и отсутствие изменений в стабильности ДНК в случае с хроническим введением витамина Д могут свидетельствовать, что витамин Д в условиях in vivo не оказывает заметного влияния на вторичную структуру ДНК.

Таблица 21

Влияние витамина $Д_2$ на характеристическую вязкость препаратов ДНК, ДНП и РНК слизистой тонкого кишечника крыс

Препарат	Концентрация витамина	Время инкубаций, *час*	Характеристическая вязкость, *дл/г*
ДНК (1)			75,0
ДНК (1)	1×10^{-5}М	0,5	75,0
ДНК (1)	1×10^{-5}М	12,0	74,0
ДНК (2)			62,0
ДНК (3)			73,0
ДНП (1)			26,0
ДНП (1)	1×10^{-5}М	0,5	31,0
ДНП (1)	1×10^{-5}М	12,0	37,0
ДНП (2)			29,0
ДНП (3)			27,0
РНК (1)			17,0
РНК (1)	1×10^{-5}М	12,0	16,0
РНК (1)	1×10^{-5}М	12,0	16,0
РНК (2)			17,5
РНК (3)			17,0

Примечание. Характеристическая вязкость препаратов ДНК, ДНП и РНК не менялась при инкубации в отсутствии витамина $Д_2$. В скобках даны условные обозначения: (1) — препараты из интактных крыс, (2) — препараты из крыс, получавших однократную дозу витамина $Д_2$ (45 000 МЕ за 4 *час* до забоя), (3) — препараты из крыс с Д-гипервитаминозом (по 45 000 МЕ в течение 5 дней).

Экстраполированные значения характеристической вязкости ДНП, ДНК и РНК слизистой тонкого кишечника при различных экспериментальных условиях представлены в таблице 21. Данные по изучению конформации препаратов ДНК в водной среде в присутствии витамина Д свидетельствуют, что витамин Д не оказывает заметного влияния на

характеристическую вязкость ДНК слизистой кишечника интактных крыс.

Характеристическая вязкость ДНП слизистой тонкого кишечника несколько повышается под влиянием витамина Д в условиях как in vitro, так и in vivo. Эффект витамина более выражен в условиях in vitro и усиливается с увеличением времени предварительной инкубации. Можно полагать, что изменение характеристической вязкости под влиянием витамина $Д_2$ обусловлено взаимодействием последнего с молекулой ДНП. Поскольку вязкость является функцией асимметрии макромолекул, можно сказать, что витамин Д влияет на конформацию препаратов ДНП, возможно, без существенного изменения его молекулярного веса.

Для полного выяснения характера взаимодействия витамина Д с нуклеиновыми кислотами и нуклеопротеидами и взаимосвязи этих процессов с механизмом физиологического действия витамина Д необходимо комплексное изучение данной проблемы с применением различных методов исследования, в том числе методами седиментационного анализа, хроматографии, электронной микроскопии и т. д. Представляет интерес изучение взаимодействия витамина Д с основаниями нуклеиновых кислот и белковым компонентом.

Полученные нами данные дают возможность полагать, что витамин Д взаимодействует с ДНП слизистой тонкого кишечника. Отсутствие изменений характера тепловой денатурации ДНП под влиянием витамина Д, очевидно, обусловлено тем, что при высоких значениях ионной силы (0,7) реакционная способность нуклеопротеида очень мала. По-видимому, для выяснения этого вопроса необходимо использовать другие методические подходы.

Таким образом, можно заключить, что для успешного выяснения механизма действия витамина Д на уровне хромосом одним из целесообразных путей может быть изучение влияния витамина Д на физико-химические свойства ДНП слизистой тонкого кишечника.

Известно, что витамин Д преобразуется в организме в различные метаболиты, часть из которых обладает выраженной Д-витаминной активностью. Витамин $Д_2$ в водной среде в условиях, близких к физиологическим (pH 7,0; 37°), подвергается быстрому аутоокислению с образованием перекисных и свободнорадикальных форм витамина (Спиричев и др., 1971). Показана также возможность образования подобных соединений и в условиях in vivo (Блажеевич, 1969). Исследования последних лет дают все больше сведений о том, что физиологическая реакция вызывается витамином

Д не в той форме, в какой он вводится в организм, а в виде его биологически активных метаболитов. Радиоактивность в ядерной (Myrtle a. oth., 1970; Suda a. oth., 1970) и хроматиновой (Haussler, Norman, 1969) фракциях слизистой тонкого кишечника рахитичных животных после введения им меченых препаратов витамина Д обусловлена главным образом не самим витамином, а его метаболитами. Время аккумуляции названных метаболитов в слизистой кишечника предшествует началу стимуляции биосинтеза РНК после введения витамина Д. Учитывая эти данные, уместно полагать, что наблюдаемые сдвиги в физико-химических свойствах макромолекул слизистой кишечника, равно как и стимуляция синтетических процессов в клетке, обусловлены не самим витамином, а продуктом (или продуктами) его трансформации.

Многочисленные исследования свидетельствуют, что действие витамина Д направлено главным образом на регуляцию гомеостаза кальция, сдвиги в котором могут приводить к специфическим изменениям в костной ткани. Поскольку полученные к настоящему времени сведения дают возможность предполагать, что витамин Д является индуктором биосинтеза транспортного белка для кальция, изучение влияния витамина Д на синтетические процессы в костной ткани представляет несомненный интерес.

Результаты исследований с применением гистохимических методов свидетельствуют, что при экспериментальном рахите в костной ткани наблюдаются значительные сдвиги в метаболизме нуклеиновых кислот (Миргазизов, 1965; Sheldon, Robinson, 1960a, b).

Было установлено, что у крыс при рахите интенсивность синтеза ДНК в эпифизарной пластинке, оцениваемая по данным гистохимических и гисторадиоавтографических методов, существенно не изменяется, и включение H^3-тимидина в ДНК наблюдается в клетках пролиферативной зоны и нижней части зоны созревания (Mankin, Lippiello, 1969). Синтез РНК в зоне пролиферации при рахите качественно не меняется, в то время как в зоне созревания наблюдается выраженное торможение биосинтеза РНК. Отмечается также снижение скорости обновления РНК в хондроцитах хрящевой пластинки при экспериментальном рахите (Simmons, Kunin, 1971). У крыс, которым после 5-недельного пребывания на рахитогенной диете в течение 6 дней вводили ежедневно по 5 000 МЕ витамина $Д_2$, интенсивность синтеза РНК быстро нарастала.

Таким образом, можно думать, что сдвиги в метаболизме нуклеиновых кислот в костной ткани, наблюдаемые при

экспериментальном рахите, нормализуются при введении витамина Д. Стимулирующее влияние витамина Д на биосинтез РНК в костной ткани, возможно, как и в случае со слизистой тонкого кишечника, направлено на образование функционального белка. Однако исследования относительно влияния витамина Д на метаболизм нуклеиновых кислот в костной ткани немногочисленны, что создает определенные трудности в интерпретации описанных данных. Не изучен еще ряд важных моментов, выяснение которых необходимо для более детального суждения о наличии корреляции между обменом нуклеиновых кислот в костной ткани и механизмом действия витамина Д.

При экспериментальном рахите у белых крыс наблюдается снижение количества РНК в печени, почках, тимусе, селезенке и головном мозгу на фоне относительного повышения содержания ДНК в названных органах (Кавтарадзе, 1969). Данные сдвиги в метаболизме нуклеиновых кислот в большинстве случаев предшествуют морфологическим изменениям, характерным для рахита, и усиливаются с увеличением тяжести заболевания. При введении витамина $Д_3$ содержание нуклеиновых кислот в названных органах нормализуется не полностью, что указывает на относительную стабильность вызванных изменений.

В опытах на рахитичных крысах было показано, что витамин $Д_3$ в дозах 10—2000 МЕ не оказывает заметного влияния на скорость инкорпорации H^3-оротовой кислоты в РНК печени и почек (Stohs a. oth., 1967). В последующем нами было обнаружено, что и более высокие дозы витамина $Д_2$ (1000—45 000 МЕ) не вызывают статистически достоверных сдвигов в скорости включения P^{32} в высокополимерную РНК печени интактных крыс в пределах 2—48 *час* после однократного введения витамина. Однако при длительном введении витамина $Д_2$ в токсических дозах наряду с выраженными признаками Д-гипервитаминоза наблюдаются значительные сдвиги в метаболизме высокополимерной РНК печени (табл. 22).

Выяснено, что при хроническом применении витамина $Д_2$ в суточных дозах 15 000, 30 000 и 45 000 МЕ в ранние сроки гипервитаминоза наблюдается увеличение, а в более поздние сроки — некоторое снижение скорости включения метки в РНК печени. Увеличение дозы витамина приводит к более выраженным изменениям в скорости биосинтеза РНК.

Длительное введение витамина $Д_2$ в суточной дозе 1000 МЕ не вызвало выраженных признаков Д-гипервитами-

ноза и заметных сдвигов в скорости включения P^{32} в высокополимерную РНК печени.

Влияние витамина Д на скорость биосинтеза РНК в печени в отличие от слизистой тонкого кишечника проявляется только с появлением признаков Д-гипервитаминоза. Следовательно, сдвиги в метаболизме РНК печени, вызванные

Таблица 22

Включение P^{32} в высокополимерную РНК печени крыс после длительного введения витамина $Д_2$ в высоких дозах

Суточная доза витамина, МЕ/100 *г*	Включение P^{32} в РНК, % к контролю, после введения витамина в течение			
	5 дней	10 дней	15 дней	20 дней
1000	103±6,1	102±5,8	105±2,3	104±4,6
15 000	112±3,2	121±4,3 P<0,02	119±3,8 P<0,05	98±5,1
30 000	131±4,7 P<0,01	135±3,1 P<0,001	123±4,5 P<0,02	96±2,8
45 000	147±5,0 P<0,001	138±6,2 P<0,01	119±4,1 P<0,05	87±5,7

Примечание. Абсолютные значения включения P^{32} в высокополимерную РНК печени контрольных животных приняты за 100%. Каждое значение представляет среднюю величину 4—8 определений. P дано только для статистически значимых изменений ($P<0,05$).

витамином Д, являются, по-видимому, результатом его токсического действия и не имеют непосредственного отношения к физиологическому эффекту витамина Д. Эти данные могут представлять определенный интерес при выяснении патогенеза заболеваний, связанных с избыточным поступлением витамина Д в организм.

Таким образом, витамин Д стимулирует включение меченых предшественников в РНК слизистой тонкого кишечника. Предварительное применение ингибиторов синтеза белка и нуклеиновых кислот блокирует данный эффект витамина Д. Присутствие витамина Д в инкубационной среде или предварительное введение его животным вызывает определенные сдвиги в некоторых физико-химических свойствах ДНК и ДНП слизистой тонкого кишечника. Обнаружено также стимулирующее влияние витамина Д на биосинтез РНК в костной ткани. Результаты этих экспериментов в

комплексе с данными, полученными в опытах по распределению витамина Д, могут свидетельствовать о влиянии последнего на уровень генетического аппарата компетентных клеток.

Участие витамина Д в регуляции обмена белка

Дальнейшим подтверждением предположения о действии витамина Д на процессы транскрипции и трансляции генетической информации явились результаты исследований по влиянию витамина Д на метаболизм белка. Изучение данных вопросов, начатое Wasserman с сотр., успешно разрабатывается в настоящее время в нескольких лабораториях.

Еще в 1963 г. Wasserman и Taylor обнаружили, что в супернатанте слизистой тонкого кишечника леченных витамином Д цыплят локализуется значительно больше радиокальция, чем в супернатанте слизистой кишечника рахитичных цыплят. В последующем авторы показали (Taylor, Wasserman, 1965), что фактор, ответственный за связывание кальция, представлен макромолекулой растворимой фазы гомогената слизистой тонкого кишечника цыплят, леченных витамином Д.

Связывающая способность кальция была продемонстрирована следующим путем. Оказалось, что скорость диффузии кальция через полупроницаемую мембрану заметно снижается в присутствии супернатанта слизистой кишечника цыплят, получавших витамин Д, чем в аналогичном случае с рахитичными цыплятами (Wasserman, Taylor, 1966). Следовательно, витамин Д-зависимый фактор слизистой кишечника каким-то образом связывает кальций и предотвращает его диффузию через полупроницаемую мембрану. В случае же с гомогенатом кишечника рахитичных цыплят вследствие отсутствия названного фактора, что в свою очередь опосредовано недостатком витамина Д, наблюдается свободный диализ кальция. Следующим важным моментом в установлении наличия в слизистой кишечника зависимого от витамина Д кальций-связывающего фактора явились исследования с применением катионообменных смол. Последний конкурирует за кальций с веществами, связывающими его. При добавлении радиокальция в среду, состоящую из суспензии нерастворимой катионообменной смолы (Chelex-100) и супернатанта слизистой кишечника распределение меченого кальция между растворимой и нерастворимой фазами зависит от концентрации растворимого кальций-связывающего

фактора в супернатанте. При наличии в подобной системе супернатанта слизистой кишечника цыплят, получавших витамин Д, радиокальция значительно больше обнаруживается в растворимой фазе, чем в случае с супернатантом кишечника цыплят с Д-витаминной недостаточностью. При повышении концентрации кальция в среде уменьшается процент относительного содержания его в растворимой фазе, что свидетельствует о насыщаемости витамин Д-зависимого кальций-связывающего фактора в слизистой кишечника. Результаты этих исследований свидетельствуют, что витамин Д стимулирует образование какого-то кальций-связывающего фактора. Рассмотрим природу и свойства этого фактора.

Экспериментальные данные, полученные в исследованиях с применением различных физико-химических методов, ультрафиолетовой спектрофотометрии и специфических ферментов, воздействующих на протеины, показывают, что стимулируемый витамином Д кальций-связывающий фактор в слизистой тонкого кишечника имеет белковую природу (Wasserman, Taylor, 1968, 1969). В частности, комплекс названного фактора с кальцием разрушается при воздействии трипсином и проназой. Фермент не оказывает влияния на активность связывания кальция у рахитичных животных. Фактор связывания разрушается при нагревании до 86° в течение 10 *мин* и сохраняется при нагревании до 70°. Он не диализируется через вискиновский целлофан. О белковой природе фактора свидетельствуют также результаты электрофоретических, хроматографических и иммунофлуоресцентных методов анализа (Ooizumi a. oth., 1970; Taylor, Wasserman, 1970).

Таким образом, можно считать установленным, что в ответ на введение витамина Д у рахитичных цыплят образуется специфический кальций-связывающий белок. Этот белок при электрофорезе в полиакриламидном геле дает одну полосу, легко обнаруживаемую в супернатанте слизистой кишечника цыплят, получавших витамин Д, и отсутствующую в тканях рахитичных цыплят. Кальций-связывающий белок обладает высокой электрофоретической подвижностью по сравнению с другими протеинами, что используется при его получении и очистке.

Витамин Д-зависимый кальций-связывающий белок был впервые выделен из надосадочной жидкости гомогената слизистой двенадцатиперстной кишки цыплят осаждением сульфатом аммония и очищен при помощи гельфильтрации через сефадекс Г-100 и препаративного диск-электрофореза в акриламидном геле (Taylor, Wasserman, 1967; Wasserman a. oth., 1968). Молекулярный вес кальций-связывающего

белка, определенный методом фильтрации через откалиброванную колонку с сефадексом Г-100 и методом седиментационного анализа, был равен соответственно $2,8\times10^4$ и $2,5\times10^4$. Константа седиментации составляла 2,96 ед. Сведберга (20°). Около 30% аминокислотного состава данного белка приходилось на долю аспарагиновой и глутаминовой кислот, 10% — лейцина и 8% — лизина.

Кальций-связывающий белок обладает высоким сродством к ионам кальция. Константы комплексообразования данного протеина для Ca, Sr и Ba равны соответственно $2,6\times10^5$ M^{-1}, $3,9\times10^4$ M^{-1} и $5,8\times10^3$ M^{-1} (Wasserman a. oth., 1968). Однако в недавних исследованиях (Wasserman, Corradino, 1971) было выявлено, что эта константа для кальция значительно выше (приблизительно в 4 раза) и составляет 10^6 M^{-1}. Кальций-связывающая активность белка имеет два максимума — при pH равном 6,3 и 9,2. Изоэлектрическая точка протеина — при pH 4,3. Поскольку N-этилмалеймид, йодоацетат и P-хлормеркурийбензоат не ингибировали реакцию связывания кальция, авторы приходят к заключению, что сульфгидрильные группы не участвуют в образовании этой связи.

Содержание кальций-связывающего белка составляет 2,5—3% от общего белка гомогената слизистой кишечника (Wasserman a. oth., 1968). Вычисления показывают, что концентрация этого протеина в эпителиальных клетках составляет приблизительно 10^{-4} M, если принять допущение, что протеин полностью высвобождается из клеток при гомогенизации и что на долю эпителиальных клеток приходится 20% влажного веса слизистой кишечника.

Недавно из слизистой тонкого кишечника крыс путем хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой были изолированы два типа зависимого от витамина Д кальций-связывающего белка (Ooizumi a. oth., 1970). При анализе их свойств с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле и определения плотности в градиенте сахарозы при ультрацентрифугировании было установлено, что молекулярный вес этих протеинов составляет 24 000 и 145 000. Первый из них (с меньшим молекулярным весом) по скорости миграции в полиакриламидном геле был идентичен кальций-связывающему белку, изолированному из слизистой кишечника цыплят. Эти протеины обладали также разной способностью связывать кальций. Белок с меньшим молекулярным весом ассоциировал лишь один атом кальция, в то время как большая молекула белка связывала более двух атомов кальция.

Витамин Д-зависимый кальций-связывающий белок, обнаруженный впервые у цыплят (Wasserman a. oth., 1968), был изолирован в последующем из слизистой кишечника крыс (Kallfelz, Taylor, 1967; Schachter a. oth., 1967; Ooizumi a. oth., 1970; Drescher, De Luca, 1971), собак (Taylor a. oth., 1968), коров (Wasserman, Corradino, 1971), обезьян (Taylor a. oth., 1968; Wasserman, Taylor, 1971) и людей (Wasserman, Corradino, 1971).

У цыплят данный протеин обнаруживается во всех сегментах тонкого кишечника, в поперечно-ободочной кишке (Taylor, Wasserman, 1970) и в почках (Taylor, Wasserman, 1967, 1970); у несущихся кур он находится и в оболочечной железе матки (Corradino a. oth., 1968). Недавно методом электрофореза в полиакриламидном геле кальций-связывающий белок выявлен в слизистой кишечника и почках некоторых рыб (карпы и щуки) (Бауман, Валиниеце, 1971). Эти протеины, выделенные у разных видов животных, наряду с общностью их основных свойств имеют и некоторые различия. Например, кальций-связывающий белок, изолированный из ткани собак, резистентен к нагреванию при 100° в течение 10 *мин,* не разрушается трипсином и имеет меньший молекулярный вес. Однако сам факт наличия витамин Д-зависимого кальций-связывающего белка в настоящее время уже не вызывает сомнения. Рядом точных методов (иммунофлуоресцентный метод, обнаружение антител к данному белку и др.) было показано образование кальций-связывающего белка у рахитичных животных в ответ на введение витамина Д.

Таким образом, указанный белок обнаруживается в тканях с напряженным минеральным обменом у самых различных животных, что свидетельствует об участии его в метаболизме кальция.

Кальций-связывающий белок обнаруживается в тканях животных, обеспеченных витамином Д, и отсутствует в тканях рахитичных особей. Следовательно, для образования названного белка необходимо наличие витамина Д. Влияние витамина на синтез кальций-связывающего белка во многом коррелирует с его действием на обмен кальция. Исходя из этих данных можно думать, что влияние витамина Д на метаболизм кальция опосредовано образованием кальций-связывающего белка. Рассмотрим данные, свидетельствующие о взаимозависимости этих процессов.

Имеется тесная корреляция между временем появления кальций-связывающего белка в слизистой кишечника и началом повышения абсорбции кальция в кишечнике у рахитичных животных в ответ на введение витамина Д (Wasser-

man, Taylor, 1966; Mac Gregor a. oth., 1970). Время обнаружения кальций-связывающего белка после введения витамина Д находится в пределах латентного периода в действии витамина Д на транспорт кальция в кишечнике. Более подробная оценка данного явления с применением различных методов (иммунодиффузия, электрофорез, катионообменные смолы) для идентификации кальций-связывающего белка показала наличие полного параллелизма между индукцией образования названного белка и кишечной абсорбцией кальция даже при условии применения витамина Д в широко варьирующих дозах (Ebel a. oth., 1969). С увеличением дозы витамина Д наблюдается укорочение продолжительности латентного периода в действии витамина Д как на абсорбцию кальция в кишечнике, так и на образование кальций-связывающего белка.

Однако имеются и данные, что эти два процесса (всасывание кальция и образование кальций-связывающего белка), зависимые от витамина Д, не являются полностью сопряженными (Harmeyer, De Luca, 1969). Авторы обнаружили, что стимуляция абсорбции кальция в кишечнике после введения рахитичным цыплятам витамина $Д_3$ наблюдается до появления кальций-связывающего белка, хотя максимум обоих показателей приходился на одинаковый промежуток времени. Возможно, что подобное утверждение обусловлено методическими трудностями обнаружения малых количеств кальций-связывающего белка в начальном периоде его образования.

Интенсивность абсорбции кальция в кишечнике и содержание кальций-связывающего белка в супернатанте мукозы увеличиваются пропорционально дозе введенного витамина Д (Ebel a. oth., 1969). Оральное введение рахитичным крысам 500 МЕ витамина $Д_2$ или $Д_3$ приводит к повышению кальций-связывающей активности гомогенатов слизистой двенадцатиперстной кишки соответственно в 3—4 раза (Kallfelz, Taylor, 1967). Повышение концентрации кальций-связывающего белка сопровождается усилением абсорбции кальция в кишечнике. Содержание витамин Д-зависимого кальций-связывающего белка в слизистой тонкого кишечника (в расчете на единицу белка в супернатанте гомогената слизистой кишечника) уменьшается в следующем порядке: двенадцатиперстная кишка — тощая кишка — подвздошная кишка (Taylor, Wasserman, 1967), что полностью соответствует способности этих участков абсорбировать кальций. Концентрация кальций-связывающего белка в тканях соответствует потребности организма в солях кальция в зависимости от возраста (молодые, пожилые) и функционального состоя-

ния животных (несущиеся куры, ненесущиеся куры) (Corradino a. oth., 1968; Wasserman, Taylor, 1969).

Интересные данные были обнаружены в исследованиях, направленных на выяснение корреляции между образованием кальций-связывающего белка и содержанием кальция в диете (Wasserman, Taylor, 1969). Цыплята, содержавшиеся первоначально на диете с нормальным уровнем кальция, переводились на низкокальциевую диету. Оба вида диеты включали адекватное количество витамина $Д_3$. При этом после некоторого снижения скорости абсорбции кальция и содержания кальций-связывающего белка в начальный период наблюдалось повышение обоих показателей с течением времени. Эти данные показывают, что молекулярной основой давно известного факта, свидетельствующего о способности адаптации животных к низкому содержанию кальция в диете, может быть повышенное образование витамин Д-зависимого кальций-связывающего белка (Wasserman, Taylor, 1969). В отличие от кальция, содержание фосфора в диете не оказывает влияния на кальций-связывающую активность белка слизистой кишечника при обеспечении витамином Д (Krawitt, Kunin, 1971).

Все эти данные в комплексе наводят на мысль о наличии тесной взаимосвязи между влиянием витамина Д на образование кальций-связывающего белка и метаболизм кальция. Появление кальций-связывающего белка в ответ на введение витамина Д сопровождается повышением абсорбции кальция, причем оба процесса протекают приблизительно в одинаковый промежуток времени. Методические возможности определяют трудности в выявлении точного времени начала каждого из этих процессов. Можно привести следующие возможные варианты включения витамин Д-зависимого кальций-связывающего белка в процессы транслокации кальция при учете различной последовательности воздействия витамина Д на образование кальций-связывающего белка и абсорбцию кальция (Wasserman, Taylor, 1969).

1. Витамин Д или его метаболит каким-то путем (возможно, воздействием на уровне генетического аппарата клеток слизистой кишечника) повышает биосинтез кальций-связывающего белка. Последний взаимодействует с мембранами эпителиальных клеток слизистой кишечника и повышает их проницаемость для ионов кальция, что в конечном счете приводит к повышению всасывания в кишечнике данного минерала. Следовательно, предполагается, что действие витамина Д на образование кальций-связывающего белка

предшествует другим биохимическим сдвигам, приводящим к усилению абсорбции кальция.

2. Витамин Д или его метаболит избирательно аккумулируется в ядерных мембранах слизистой кишечника (Zull a. oth., 1966a), взаимодействует с ним и, влияя на их проницаемость для ионов кальция, меняет внутриклеточное распределение кальция.

В настоящее время трудно судить, предшествует ли изменение мембранной проницаемости образованию кальций-связывающего белка в ответ на введение витамина Д, или изменение скорости биосинтеза данного белка приводит к определенным сдвигам в структуре и функциональной активности липопротеиновых мембран. Однако ни при одной из указанных возможностей не отрицается сам факт образования кальций-связывающего белка в ответ на введение витамина Д.

Следующий важный аспект в изучении кальций-связывающего белка имеет отношение к выяснению вопроса, синтезируется ли названный протеин de novo в ответ на введение витамина Д или происходит лишь определенная трансформация (или активация) предсуществующих белковых молекул; обусловлено ли образование протеина индукцией генетического материала клеток витамином Д или его метаболитами. Разрешение этих вопросов необходимо для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе взаимодействия витамина Д в клетке и некоторых резистентных к витамину Д наследственных рахитоподобных заболеваний.

Данные о стимулирующем влиянии витамина Д на биосинтез белка подтвердились в опытах с применением меченых аминокислот. В частности, было показано, что витамин $Д_3$ стимулирует включение меченого лизина в суммарные белки субклеточных фракций слизистой тонкого кишечника рахитичных цыплят (Norman a. oth., 1969).

Анализ включения глицина-1-C^{14} в белки субклеточных фракций (ядерная, митохондриальная, микросомальная и супернатант) слизистой тонкого кишечника, печени, почки, тимуса и селезенки интактных крыс, проведенный нами, показал, что имеется существенная разница в действии витамина $Д_2$ на биосинтез белка в названных органах (Сергеев и др., 1973). Однократное введение витамина $Д_2$ в дозах 1 000, 15 000, 30 000 и 45 000 МЕ стимулирует включение аминокислоты в белки слизистой кишечника, но не оказывает заметного влияния на биосинтез белка в других органах. Сдвиги в метаболизме белка в печени, почках, тимусе и селезенке наступают лишь при длительном применении токсических

доз витамина. Стимулирующий эффект витамина $Д_2$ на включение глицина-1-C^{14} в суммарные белки гомогенатов и субклеточных фракций слизистой тонкого кишечника зависит от дозы и сроков применения препарата (табл. 23). Величина эффекта оказалась пропорциональной дозе препарата и была максимальной после инъецирования витамина в дозе 45 000 МЕ. Стимулирующий эффект витамина Д был незначительным при применении его в дозе 100 МЕ. С увеличением дозы витамина $Д_2$ укорачивался латентный период между его введением и началом повышения скорости инкорпорации радиометки в белковые фракции. Время повышения биосинтеза белка в зависимости от дозы введенного витамина находится в пределах латентного периода влияния витамина Д на транспорт кальция в кишечнике (от 4 до 24 *час*, по данным Norman, 1966).

Таким образом, величина дозо-зависимого эффекта и длительность латентного периода в действии витамина $Д_2$ на биосинтез белка в слизистой тонкого кишечника интактных крыс коррелируют с данными о стимулирующем влиянии витамина Д на биосинтез РНК и транспорт кальция в кишечнике. Это служит еще одним подтверждением наличия тесной взаимосвязи между стимулирующим эффектом витамина Д на синтетические процессы в слизистой кишечника и влиянием его на метаболизм кальция.

Нами проведен также анализ сдвигов в метаболизме белка в слизистой тонкого кишечника при хроническом введении витамина $Д_2$ в относительно высоких дозах. Повторное введение витамина $Д_2$ интактным крысам в течение 5, 10, 15 и 20 дней в суточных дозах 15 000, 30 000 и 45 000 МЕ оказало стимулирующее влияние на включение глицина-1-C^{14} в белки гомогенатов и субклеточных фракций слизистой тонкого кишечника (табл. 24). Данный эффект витамина более выражен в ранние сроки гипервитаминоза. Величина эффекта оказалась пропорциональной дозе препарата. Наибольшие сдвиги обнаружены при этом в микросомальной фракции. Стимулирующий эффект витамина $Д_2$ на инкорпорацию меченой аминокислоты в белки слизистой кишечника при хроническом введении его в суточной дозе 1000 МЕ был незначительным.

Стимулирующее влияние высоких доз витамина Д на включение глицина-1-C^{14} в белки слизистой тонкого кишечника согласуется с данными, свидетельствующими о повышенной абсорбции кальция в кишечнике при Д-гипервитаминозе. Возможно, усиленное образование кальций-связывающего белка при Д-витаминной интоксикации обусловлива-

Таблица 23

Включение глицина-1-C^{14} в белки субклеточных фракций слизистой тонкого кишечника крыс под влиянием однократной дозы витамина $Д_2$

Фракция	Доза витамина, МЕ/100 *г*	Включение глицина-1-C^{14} в белки, % к контролю, после введения витамина через					
		2 *час*	4 *час*	8 *час*	12 *час*	24 *час*	48 *час*
Гомогенат	100	101,3±4,2	95,7±6,1	94,1±3,5	103,0±5,7	109,2±5,9	97,5±1,8
	1000	97,9±5,8	93,1±5,2	101,4±6,1	118,3±4,3 P<0,05	112,4±3,7	101,9±4,9
	15 000	88,6±6,1	103,4±3,5	121,1±4,0 P<0,02	122,9±3,4 P<0,01	115,4±3,9 P<0,05	106,1±3,0
	30 000	91,0±2,7	117,1±3,9 P<0,05	134,6±3,3 P<0,001	121,2±5,5 P<0,05	116,8±4,1 P<0,05	93,2±6,1
	45 000	93,4±5,5	125,9±4,1 P<0,01	132,0±5,5 P<0,01	122,5±4,2 P<0,02	119,1±5,0 P<0,05	102,6±2,8
Ядра	100	95,4±1,8	92,8±3,7	98,1±6,0	105,0±4,7	102,6±2,7	101,2±5,6
	1000	91,7±2,6	96,1±5,2	104,9±3,1	115,3±5,2	113,1±6,1	108,6±4,7
	15 000	83,0±7,1	104,3±4,7	117,0±5,2	119,1±3,8 P<0,05	116,4±4,2 P<0,05	107,9±6,2
	30 000	87,4±5,8	108,1±6,1	130,7±4,7 P<0,01	123,2±4,2 P<0,02	119,3±5,0 P<0,05	111,2±3,8
	45 000	91,2±6,7	121,3±3,8 P<0,02	132,3±3,9 P<0,01	128,9±4,5 P<0,01	121,5±3,9 P<0,02	106,4±2,0
	100	101,5±7,2	98,4±4,7	103,6±5,1	108,1±2,2	106,0±3,6	100,5±4,5
	1000	93,0±1,9	95,1±3,2	106,1±4,8	108,9±5,7	104,5±6,1	104,3±2,3
	15 000	95,4±2,9	101,6±5,6	120,3±4,0 P<0,02	117,1±4,1 P<0,05	112,2±3,8	106,7±5,1
Митохондрии	30 000	100,8±8,1	110,7±4,5	121,4±5,7 P<0,05	124,2±3,5 P<0,01	118,4±2,7 P<0,05	115,1±3,9
	45 000	99,1±5,6	123,4±3,7 P<0,01	124,8±3,9 P<0,01	118,9±4,6 P<0,05	121,1±4,2 P<0,02	112,8±6,7
Микросомы	100	103,0±6,5	97,6±4,6	95,2±3,1	105,7±6,3	108,2±2,7	102,6±5,4
	1000	96,7±4,8	101,4±3,7	97,7±2	117,2±3,8 P<0,05	118,4±3,1 P<0,05	104,9±2,9
	15 000	92,3±5,9	94,6±4,2	121,0±5,1 P<0,05	118,7±3,8 P<0,05	120,2±4,3 P<0,05	113,1±3,2
	30 000	97,6±4,7	122,0±4,4 P<0,02	139,4±4,1 P<0,01	112,2±5,3	118,8±3,7 P<0,05	111,4±6,3
	45 000	102,2±7,3	131,3±5,0 P<0,001	140,1±3,3 P<0,01	120,8±4,1 P<0,02	117,4±7,1	115,0±5,8
Супернатант	100	92,1±3,2	95,4±3,8	100,6±5,2	104,3±4,8	105,0±1,7	102,3±7,6
	1000	95,5±5,7	97,8±7,1	102,3±4,0	111,5±3,6	113,1±5,5	103,6±2,9
	15 000	101,4±7,1	109,1±5,4	123,3±3,5	115,0±6,2	117,4±2,8	109,0±3,3
	30 000	88,2±8,0	120,4±4,3 P<0,02	124,9±2,8 P<0,01	118,8±3,6 P<0,05	114,6±6,2	111,2±5,7
	45 000	91,4±2,9	126,7±3,9 P<0,01	123,2±4,1 P<0,02	120,5±4,7 P<0,05	112,0±3,5	108,9±6,1

Примечание. Абсолютные значения включения глицина-1-C^{14} в белки контрольных животных приняты за 100%. Каждое значение представляет среднюю величину 4—8 определений. Р дано только для статистически значимых изменений ($P<0,05$).

Таблица 23

Включение глицина-1-C^{14} в белки субклеточных фракций слизистой тонкого кишечника крыс под влиянием однократной дозы витамина $Д_2$

Фракция	Доза витамина, МЕ/100 *г*	Включение глицина-1-C^{14} в белки, % к контролю, после введения витамина через					
		2 *час*	4 *час*	8 *час*	12 *час*	24 *час*	48 *час*
Гомогенат	100	101,3±4,2	95,7±6,1	94,1±3,5	103,0±5,7	109,2±5,9	97,5±1,8
	1000	97,9±5,8	93,1±5,2	101,4±6,1	118,3±4,3 P<0,05	112,4±3,7	101,9±4,9
	15 000	88,6±6,1	103,4±3,5	121,1±4,0 P<0,02	122,9±3,4 P<0,01	115,4±3,9 P<0,05	106,1±3,0
	30 000	91,0±2,7	117,1±3,9 P<0,05	134,6±3,3 P<0,001	121,2±5,5 P<0,05	116,8±4,1 P<0,05	93,2±6,1
	45 000	93,4±5,5	125,9±4,1 P<0,01	132,0±5,5 P<0,01	122,5±4,2 P<0,02	119,1±5,0 P<0,05	102,6±2,8
Ядра	100	95,4±1,8	92,8±3,7	98,1±6,0	105,0±4,7	102,6±2,7	101,2±5,6
	1000	91,7±2,6	96,1±5,2	104,9±3,1	115,3±5,2	113,1±6,1	108,6±4,7
	15 000	83,0±7,1	104,3±4,7	117,0±5,2	119,1±3,8 P<0,05	116,4±4,2 P<0,05	107,9±6,2
	30 000	87,4±5,8	108,1±6,1	130,7±4,7 P<0,01	123,2±4,2 P<0,02	119,3±5,0 P<0,05	111,2±3,8
	45 000	91,2±6,7	121,3±3,8 P<0,02	132,3±3,9 P<0,01	128,9±4,5 P<0,01	121,5±3,9 P<0,02	106,4±2,0
	100	101,5±7,2	98,4±4,7	103,6±5,1	108,1±2,2	106,0±3,6	100,5±4,5
	1000	93,0±1,9	95,1±3,2	106,1±4,8	108,9±5,7	104,5±6,1	104,3±2,3
	15 000	95,4±2,9	101,6±5,6	120,3±4,0 P<0,02	117,1±4,1 P<0,05	112,2±3,8	106,7±5,1

Митохондрии	30 000	100,8±8,1	110,7±4,5	121,4±5,7 P<0,05	124,2±3,5 P<0,01	118,4±2,7 P<0,05	115,1±3,9
	45 000	99,1±5,6	123,4±3,7 P<0,01	124,8±3,9 P<0,01	118,9±4,6 P<0,05	121,1±4,2 P<0,02	112,8±6,7
Микросомы	100	103,0±6,5	97,6±4,6	95,2±3,1	105,7±6,3	108,2±2,7	102,6±5,4
	1000	96,7±4,8	101,4±3,7	97,7±2	117,2±3,8 P<0,05	118,4±3,1 P<0,05	104,9±2,9
	15 000	92,3±5,9	94,6±4,2	121,0±5,1 P<0,05	118,7±3,8 P<0,05	120,2±4,3 P<0,05	113,1±3,2
	30 000	97,6±4,7	122,0±4,4 P<0,02	139,4±4,1 P<0,01	112,2±5,3	118,8±3,7 P<0,05	111,4±6,3
	45 000	102,2±7,3	131,3±5,0 P<0,001	140,1±3,3 P<0,01	120,8±4,1 P<0,02	117,4±7,1	115,0±5,8
Супернатант	100	92,1±3,2	95,4±3,8	100,6±5,2	104,3±4,8	105,0±1,7	102,3±7,6
	1000	95,5±5,7	97,8±7,1	102,3±4,0	111,5±3,6	113,1±5,5	103,6±2,9
	15 000	101,4±7,1	109,1±5,4	123,3±3,5	115,0±6,2	117,4±2,8	109,0±3,3
	30 000	88,2±8,0	120,4±4,3 P<0,02	124,9±2,8 P<0,01	118,8±3,6 P<0,05	114,6±6,2	111,2±5,7
	45 000	91,4±2,9	126,7±3,9 P<0,01	123,2±4,1 P<0,02	120,5±4,7 P<0,05	112,0±3,5	108,9±6,1

Примечание. Абсолютные значения включения глицина-1-C^{14} в белки контрольных животных приняты за 100%. Каждое значение представляет среднюю величину 4—8 определений. P дано только для статистически значимых изменений (P < 0,05).

Таблица 24

Включение глицина-1-C^{14} в белки субклеточных фракций слизистой тонкого кишечника крыс после длительного введения витамина $Д_2$ в высоких дозах

Фракция	Суточная доза витамина, МЕ/100 *г*	Включение глицина-1-C^{14} в белки, % к контролю, после введения витамина в течение			
		5 дней	10 дней	15 дней	20 дней
Гомогенат	1000	104,7±3,2	106,9±7,8	109,1±5,2	104,3±6,8
	15000	131,2±5,1 P<0,01	127,4±4,1 P<0,01	118,3±4,8 P<0,05	109,8±7,2
	30000	142,3±4,2 P<0,001	144,7±3,2 P<0,001	127,4±3,8 P<0,01	120,9±5,5 P<0,05
	45000	144,5±4,9 P<0,001	148,7±4,4 P<0,001	115,1±4,0 P<0,05	122,4±3,1 P<0,01
Ядра	1000	96,5±6,7	105,1±3,7	106,9±6,1	104,5±4,8
	15000	121,8±5,8 P<0,05	128,3±2,1 P<0,01	122,5±4,5 P<0,02	119,7±6,0
	30000	131,3±5,0 P<0,01	136,9±5,8 P<0,01	139,1±3,9 P<0,001	135,3±4,3 P<0,02
	45000	140,9±3,5 P<0,001	138,4±2,9 P<0,001	134,7±5,6 P<0,01	129,2±3,9 P<0,01
Митохондрии	1000	100,7±4,6	106,1±2,1	103,7±4,8	104,1±3,2
	15000	115,2±7,1	121,0±4,5 P<0,02	123,2±4,4 P<0,02	117,6±7,1
	30000	129,7±6,5 P<0,02	132,4±4,8 P<0,01	127,0±3,7 P<0,01	115,3±6,2
	45000	137,1±3,0 P<0,001	128,7±3,5 P<0,01	116,4±2,9 P<0,05	126,5±3,5 P<0,01
Микросомы	1000	110,5±4,7	108,3±4,1	104,9±7,2	107,0±5,3
	15000	126,1±5,2 P<0,02	136,7±5,2 P<0,01	129,0±6,3 P<0,05	125,2±4,9 P<0,02
	30000	139,0±3,7 P<0,001	140,5±3,0 P<0,001	132,3±5,1 P<0,01	119,4±6,1
	45000	151,4±4,2 P<0,001	152,5±3,8 P<0,001	142,1±3,7 P<0,001	135,0±5,2 P<0,01
Супернатант	1000	102,0±4,5	104,3±5,2	103,1±4,5	104,9±3,7
	15000	111,8±4,7	119,3±4,9 P<0,05	121,0±5,7 P<0,05	117,7±6,1
	30000	117,4±3,2 P<0,05	123,1±6,2 P<0,05	127,9±4,3 P<0,01	121,0±3,5 P<0,01
	45000	132,8±5,1 P<0,01	129,0±3,8 P<0,01	117,1±6,1	122,6±4,4 P<0,02

Примечание. Абсолютные значения включения глицина-1-C^{14} в белки контрольных животных приняты за 100%. Каждое значение представляет среднюю величину 4—8 определений. P дано только для статистически значимых изменений (P<0,05).

Таблица 25

Включение глицина-1-C^{14} в белки гомогенатов и субклеточных фракций слизистой тонкого кишечника крыс (в зависимости от времени введения меченого предшественника) при гипервитаминозе $Д_2$

Фракция	Включение C^{14} в белки, % к контролю, после введения глицина-1-C^{14} через			
	2 час	*24 час*	*48 час*	*96 час*
Гомогенат	145±4,9 P<0,001	120±3,3 P<0,01	84±3,7 P<0,05	51±4,8 P<0,001
Ядра	141±3,5 P<0,001	119±4,2 P<0,05	89±4,7	49±5,0 P<0,001
Митохондрии	138±3,0 P<0,001	121±4,0 P<0,02	91±5,9	56±3,7 P<0,001
Микросомы	151±4,2 P<0,001	117±3,9 P<0,05	78±5,1 P<0,05	42±5,1 P<0,001
Супернатант	133±5,1 P<0,001	122±3,5 P<0,01	101±6,2	60±6,2 P<0,01

Примечание. Абсолютные значения включения глицина-1-C^{14} в белки контрольных животных приняты за 100%. Каждое значение представляет среднюю величину 4—8 определений. P дано только для статистически значимых изменений ($P<0,05$).

ет ускорение абсорбции кальция в кишечнике и гиперкальцемию.

В таблице 25 представлены результаты наших исследований, направленных на изучение скорости обмена белка в слизистой тонкого кишечника крыс при моделировании гипервитаминоза $Д_2$. Масляный раствор витамина $Д_2$ в суточной дозе 45 000 МЕ вводили интактным крысам желудочным зондом в течение 5 дней, что привело к развитию у животных признаков Д-гипервитаминоза.

О скорости биосинтеза и распада белка судили по включению глицина-1-C^{14}, вводимого в различные промежутки времени (через 2, 24, 48 и 96 *час*) до забоя. Полученные при этом результаты показывают, что при гипервитаминозе $Д_2$ скорость биосинтеза белка, оцениваемая по скорости включения меченой аминокислоты, введенной животным за 2 *час* до забоя, повышается. Данный эффект сохраняется и через 24 *час*, однако через 48 и 96 *час* после введения радиоактивность белка у крыс опытной группы по сравнению с контрольной была значительно снижена. Это может свидетельствовать о том, что при Д-гипервитаминозе наблюдается повышение скорости как биосинтеза, так и распада белка в слизистой тонкого кишечника. Следовательно, в данном случае наблюдается повышение скорости обмена белка. По-

добные данные были получены и в опытах на рахитичных цыплятах при введении последним витамина $Д_3$ в относительно меньшей дозе (5 000 МЕ) (Norman a. oth., 1969). Однако роль наблюдаемого повышения скорости обмена белка в слизистой кишечника в ответ на введение витамина Д остается неизвестной.

Таким образом, как однократное, так и длительное введение витамина Д приводит к повышению скорости включения меченых аминокислот в суммарные мукопротеиды субклеточных фракций слизистой кишечника. Данный эффект витамина Д частично обусловлен, по-видимому, образованием de novo кальций-связывающего белка в ответ на введение витамина Д. Это подтверждается тем, что витамин $Д_3$, вводимый рахитичным цыплятам, повышает скорость включения H^3-лейцина не только в суммарные мукопротеиды слизистой кишечника, но также непосредственно во фракцию кальций-связывающего белка (Mac Gregor a. oth., 1970). Можно думать, что наблюдаемая значительная стимуляция включения аминокислот в суммарные протеиды мукозы кишечника при введении животным высоких доз витамина Д отражает не только биосинтез кальций-связывающего белка (учтем при этом, что концентрация последнего составляет лишь 2—3% от тотального белка гомогената слизистой кишечника), но является также результатом его неспецифического влияния на белковый метаболизм. Последнее может быть опосредовано действием витамина Д на проницаемость липопротеиновых мембран для ионов и метаболитов, на вне- и внутриклеточную концентрацию ионов, на гормональный статус организма и другие факторы.

Заслуживают внимания данные Corradino и Wasserman (1968), из которых следует, что предварительное введение актиномицина Д ингибирует образование индуцируемого витамином Д кальций-связывающего белка. По-видимому, ингибирующий эффект данного антибиотика на опосредованное витамином Д повышение абсорбции кальция в кишечнике обусловлен блокадой синтеза кальций-связывающего белка на уровне передачи генетической информации от ДНК к информационной РНК. Данное предположение подтверждается тем, что метаболические ингибиторы (актиномицин Д, циклогексемид, пуромицин), блокирующие различные звенья системы биосинтеза белка, предотвращают стимулирующий эффект витамина Д на биосинтез РНК, кальций-связывающего белка и абсорбцию кальция в кишечнике.

Наличие кальций-связывающего белка у животных, получавших витамин Д, и отсутствие его в тканях при рахите, стимулирующее влияние витамина Д на включение амино-

кислот как в суммарные мукопротеиды, так и во фракцию кальций-связывающего белка и ингибирующий эффект актиномицина Д и циклогексемида при образовании последнего могут свидетельствовать в пользу предположения, что происходит биосинтез кальций-связывающего белка de novo в ответ на введение витамина Д. Однако имеются и другие мнения, а именно, что кальций-связывающий белок образуется под влиянием витамина Д из предшественника белковой природы (Drescher, De Luca, 1971). Последнее предположение обосновывается на следующих данных. После введения витамина $Д_2$ рахитичным крысам в супернатанте слизистой тонкого кишечника наблюдали появление нового протеина (хроматографическая полоса С — по обозначению авторов), который по хроматографическим и другим показателям оказался идентичным с кальций-связывающим белком. Одновременно с появлением этого нового протеина наблюдалось уменьшение содержания другого белка (хроматографическая полоса А) с бóльшим молекулярным весом. Эти сдвиги были подтверждены анализом инкорпорации меченых аминокислот в названные белковые фракции. Авторы приходят к заключению, что образование кальций-связывающего белка не представляет собой биосинтез de novo, а является скорее результатом превращения предсуществующего белка (полоса А) в кальций-связывающий белок (полоса С). При этом допускается возможность, что витамин Д, его метаболиты и ионы кальция каким-то образом стимулируют гидролиз полипептидного фрагмента белкового предшественника, что приводит к образованию кальций-связывающего белка.

Было бы целесообразно рассмотреть возможное влияние метаболитов витамина Д на белковый обмен in vivo, так как изучение данного вопроса, несомненно, представляет большой интерес. Результаты исследований индуцирующего влияния витамина $Д_3$ и его метаболита (25-оксихолекальциферола) на биосинтез кальций-связывающего белка в кишечнике куриных эмбрионов in vitro, полученные недавно Corradino и Wasserman (1971), свидетельствуют о новых взаимоотношениях витамин — рецептор. Авторы показали, что витамин $Д_3$, добавленный в дозе не менее 25 МЕ/*мл* к культуре двенадцатиперстной кишки 20-дневного куриного эмбриона, приводит к образованию кальций-связывающего белка. Добавление к культуральной среде актиномицина Д, циклогексемида или пуромицина блокировало названный эффект витамина. Кроме витамина $Д_3$ активными в стимуляции образования кальций-связывающего белка оказались витамин $Д_2$, дигидротахистерин$_2$ и биологически активный метаболит

витамина $Д_3$—25-оксихолекальциферол. Стимулирующий эффект этих соединений на биосинтез кальций-связывающего белка был также подтвержден анализом кинетики инкорпорации H^3-лейцина в названный протеин. Предварительная инкубация культуры в течение 48 *час* с витамином $Д_3$ значительно повышала способность ее поглощать меченый кальций.

Таким образом, и в условиях in vitro наблюдается корреляция между влиянием витамина Д на биосинтез кальций-связывающего белка и абсорбцией кальция. Примечательно, что 25-оксихолекальциферол, являющийся более активным соединением по сравнению с витамином $Д_3$ при оценке влияния на абсорбцию кальция, оказался в 2—3 раза активнее витамина $Д_3$ в стимуляции биосинтеза кальций-связывающего белка. Можно думать, что образование последнего, как и в случае с биосинтезом РНК и абсорбцией кальция в кишечнике, обусловливает биологически активный метаболит (или метаболиты) витамина Д. Однако прямые подтверждения такого предположения еще не получены.

Приведенные данные с несомненностью свидетельствуют об образовании кальций-связывающего белка в ответ на введение витамина Д и возможном участии данного протеина в метаболизме кальция. В связи с этим, естественно, представляет интерес изучение возможных механизмов участия кальций-связывающего белка в транслокации кальция. Поскольку процесс абсорбции кальция в кишечнике так или иначе связан с проникновением ионов кальция через липопротеиновые мембраны, прежде всего, по-видимому, необходимо изучить точную локализацию этого белка и характера его взаимодействия с клеточными мембранами.

В исследованиях с применением иммунофлуоресцентного метода было выявлено, что кальций-связывающий белок присутствует в бокаловидных клетках слизистой тонкого кишечника и связан с поверхностной оболочкой (гликокаликс) и/или со щеточной каймой микроворсинок эпителиальных клеток кишечника (Taylor, Wasserman, 1970). В тканях рахитичных цыплят определяются лишь неспецифические флуоресцирующие пятна, что свидетельствует об отсутствии у них указанного белка. Однако чувствительность метода оказалась недостаточной для выяснения вопроса, локализуется ли этот белок только на поверхности микроворсинок или в пределах самих клеток. Располагаясь на поверхности раздела слизистой и просвета кишечника, кальций-связывающий белок, очевидно, может участвовать в одной из ранних стадий процесса абсорбции кальция, создавая высокую концентрацию кальция на этой поверхности.

Принимая во внимание наличие высокой константы образования комплекса между ионами кальция и кальций-связывающим белком, можно думать о потребности специального механизма диссоциации данного комплекса на определенных стадиях абсорбции кальция. Косвенным подтверждением возможности существования подобного механизма могут служить результаты исследований взаимодействия кальций-связывающего белка с лизолецитином (Wasserman, 1970). Авторами было выявлено, что кальций-связывающий белок, выделенный из слизистой кишечника цыплят, образует с лизолецитином комплекс, который не диссоциирует в электрическом поле.

При равновесном диализе кальций-связывающего белка в присутствии Ca^{45} и применении метода ионообменных смол было также показано, что взаимодействие лизолецитина с протеином сопровождается ингибированием его кальций-связывающей активности.

Исходя из этих данных можно предположить, что кальций-связывающий белок проникает в матрикс липопротеиновых оболочек и взаимодействует с их липидным компонентом, что приводит к высвобождению кальция из комплекса в пределах матрикса мембран. Возможно также, что зависимый от витамина Д указанный белок является компонентом липопротеиновых оболочек клеток слизистой кишечника, присутствие которого определяет структурные и функциональные сдвиги в мембранах, необходимые для нормальной абсорбции кальция в кишечнике.

Wasserman и Taylor (1969) предполагают следующий возможный механизм участия кальций-связывающего белка в процессах абсорбции кальция:

1) связывание кальция кальций-связывающим белком на поверхности раздела между кишечным содержимым и мембранами микроворсинок;

2) высвобождение кальция в пределах гидрофобной части мембраны;

3) диффузия несвязанного кальция из мембраны в цитоплазму клеток или обратно в просвет кишечника.

Хотя диффузионный процесс не является однонаправленным, названная схема предполагает возрастание скорости транспорта кальция вследствие повышения концентрации последнего в мембранах, что, в свою очередь, обусловлено присутствием кальций-связывающего белка. При такой интерпретации вопроса последний может теоретически повышать скорость передвижения кальция в любом из двух направлений (слизистая⟶сероза; сероза⟶слизистая), что согласуется с результатами исследований, свидетельствую-

щих о способности витамина Д стимулировать как всасывание, так и выделение кальция через слизистую кишечника.

Ooizumi и др. (1970) предполагают, что обнаруженные ими два вида кальций-связывающего белка в слизистой тонкого кишечника крыс, различающиеся по своему молекулярному весу, могут участвовать на разных стадиях транспорта кальция следующим образом. Кальций-связывающий белок с меньшим молекулярным весом, располагаясь на поверхности клеток слизистой кишечника, связывает один атом кальция и транспортирует его к белку с бо́льшим молекулярным весом. Последний, локализуясь в пределах клеток слизистой кишечника, связывает более чем два атома кальция, транспортирует их через клетки мукозы и выделяет кальций в окружающую жидкость.

Суммируя изложенное, можно сказать, что образование кальций-связывающего белка в ответ на введение витамина Д и участие данного протеина в процессах абсорбции кальция в кишечнике уже не вызывает сомнения. Результаты исследований, проведенных к настоящему времени, дают возможность определить некоторые пути участия кальций-связывающего белка в абсорбции кальция в кишечнике, хотя механизм данного явления еще не выяснен. Надлежит детально изучить вопрос, играет ли кальций-связывающий белок основную или, возможно, единственную роль в витамин Д-зависимом процессе абсорбции кальция. Возможно также, что данный протеин участвует лишь в одной из стадий системы абсорбции кальция, стимулируемой витамином Д. Как бы ни было, детальное изучение влияния кальций-связывающего белка в транспорте кальция представляет огромный интерес для выяснения молекулярных механизмов действия витамина Д. Не определена еще роль данного протеина в обмене кальция в костной ткани и почках, хотя эти вопросы также заслуживают большого внимания.

В настоящее время накоплен значительный фактический материал, свидетельствующий о влиянии витамина Д на общий белковый обмен в организме. Это выражается появлением определенных сдвигов в абсорбции, утилизации и экскреции аминокислот, в биосинтезе белка в некоторых тканях и в белковом спектре крови при недостаточном или избыточном поступлении витамина Д в организм. Выяснение сущности подобного действия витамина Д тесно соприкасается также с изучением механизмов возникновения рахита и Д-гипервитаминоза и с вопросами терапии данных состояний.

Gittlman и Pincus (1940) впервые обнаружили повышенную альбуминурию при рахите. В последующем многими ис-

следователями (Jonxis, 1955; Chisolm a. oth., 1955; Chisolm, Harrison, 1962; Brodehl a. oth., 1971) было неоднократно показано, что недостаточное поступление витамина Д сопровождается гипераминоацидурией. Общее количество аминокислот в суточной моче при рахите составляет 255—510 *мг* (Jonxis, 1955). Некоторые авторы (Opienska-Blauth a. oth., 1966) считают, что для рахита с повреждением костей характерен глицин-серин-феномен. По данным других исследователей (Jonxis, Huisman, 1953; Boyer a. oth., 1956; Brodehl a. oth., 1971), помимо глицина и серина при Д-витаминной недостаточности усилена экскреция лизина, гистидина, аланина, треонина и глутаминовой кислоты. Значительно меньше или совсем не нарушен обмен валина, тирозина и аргинина. Гипераминоацидурия при рахите обусловлена значительным снижением канальцевой реабсорбции и увеличением гломерулярной фильтрации аминокислот (Chisolm, Harrison, 1962; Brodehl a. oth., 1971). Эти сдвиги являются, по-видимому, прямым следствием недостаточности витамина Д, что указывает на возможную роль последнего или его метаболитов в механизме канальцевой реабсорбции свободных аминокислот.

При изучении распределения меченого S^{35}-радиометионина (Гарсеванишвили, 1958) в тканях печени, почек, головного мозга, вилочковой железы, селезенки, кости, желудка, тонкого и толстого кишечника, в крови было выявлено снижение скорости биосинтеза белка в данных органах. Однако уменьшение скорости включения S^{35}-метионина в клеточные белки сопровождалось увеличением содержания данной аминокислоты в сырой ткани. Следовательно, можно думать о нарушении утилизации аминокислот при недостаточности витамина Д. По-видимому, снижение скорости биосинтеза или повышенный распад вновь синтезированного белка при рахите в какой-то степени обусловливают усиленную аминоацидурию.

Терапия рахита витаминами $Д_2$ и $Д_3$ приводит к нормализации содержания аминокислот в моче (Jonxis, Huisman, 1953). Данный эффект витамина Д, очевидно, обусловлен улучшением и нормализацией обмена белка в организме.

Недавно было выяснено, что витамин Д оказывает влияние не только на экскрецию, но и на абсорбцию аминокислот. У кроликов с экспериментальным рахитом наблюдалось снижение скорости транспорта L-гистидина в слизистой кишечника, а введение витамина Д приводило к повышению абсорбции данной аминокислоты (Sugai, Matsuda, 1968). Впоследствии было обнаружено, что предварительное инъецирование кроликам актиномицина Д частично ингибирует дан-

ный эффект витамина Д (Sugai, Matsuda, 1971). На основании этих данных авторы приходят к мнению, что, возможно, влияние витамина Д на абсорбцию L-гистидина обусловлено биосинтезом белка-переносчика. Однако антибиотик не полностью ингибирует эффект витамина Д, в связи с чем авторы предполагают также наличие какого-то другого механизма в стимуляции витамином Д абсорбции аминокислоты в кишечнике. Этот механизм, возможно, связан с влиянием витамина Д на структуру и функциональную активность цитомембран.

Витамин Д не оказывал эффекта на абсорбцию или концентрацию α-аминоизомасляной кислоты в ткани кишечника и плазме крови (Vounoszai, Schedl, 1970). Следовательно, можно думать, что влияние витамина Д на транспорт аминокислот в кишечнике носит избирательный характер.

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о наличии выраженной диспротеинемии как при недостаточности, так и при избыточном поступлении витамина Д. Уже в начальной стадии рахита наблюдается повышение относительного содержания α_1- и α_2-глобулинов, сопровождающееся уменьшением концентрации альбуминов в плазме крови (Юзеева, 1961, 1963; Дмитриева, 1965; Володина, 1966, 1967; Macciota, 1964). В последующем происходит снижение содержания в крови общего белка, альбуминов и γ-глобулинов, падает альбумино-глобулиновый коэффициент. С увеличением тяжести заболевания названные сдвиги прогрессируют, и при тяжелой степени рахита в ряде случаев наблюдается эндогенная белковая недостаточность. Таким образом, при Д-авитаминозе наблюдаются количественные (уменьшение) и качественные (уменьшение мелкодисперсных и увеличение крупнодисперсных белковых фракций) сдвиги в биосинтезе плазменных белков. Как известно, основная часть плазменных белков синтезируется в печени. Следовательно, можно думать, что названные сдвиги в содержании белка в плазме при недостаточности витамина Д обусловлены главным образом нарушением регуляции белоксинтезирующей функции печени. Лечение витамином Д при рахите приводит к нормализации этих процессов. Изучение белкового спектра крови больных Д-гипервитаминозом показало, что в период выраженных проявлений заболевания при нормальном содержании общего белка в крови наблюдается заметное снижение уровня альбуминов, сопровождающееся увеличением содержания α_2-, β- и особенно γ-глобулинов (Вишневский, 1970). При этом соответственно понижается альбумино-глобулиновый коэффициент. Концентрация глобулинов остается на относительно постоянном уровне.

Липопротеидный спектр крови детей при $Д_2$-гипервитаминозе характеризуется более высоким, чем у здоровых, содержанием α-липопротеидов и меньшим уровнем в крови β-липопротеидов. Характер спектра крови во многом зависит от степени и длительности интоксикации, вызванной передозировкой витамина Д.

У кроликов при введении витамина $Д_3$ в высоких дозах одновременно с повышением концентрации кальция и неорганического фосфора наблюдается увеличение содержания общего белка в сыворотке крови (Dehnen, Dirscherl, 1966). Электрофоретический анализ показал при этом повышение содержания гликопротеида в области фракции α_2-глобулинов. При дополнительном введении с витамином Д актиномицина С образование данного гликопротеида подавлялось. Авторы полагают, что витамин $Д_3$ обладает специфическим действием на биосинтез названного гликопротеида.

Нами проведено комплексное изучение влияния различных доз витамина $Д_2$ на биосинтез белка в печени, почках, тимусе и селезенке интактных крыс. Исследования проводили после однократного (по 1 000, 15 000, 30 000 и 45 000 МЕ за 2, 4, 8, 12, 24 и 48 *час* до забоя) и длительного (в суточных дозах 1 000—45 000 МЕ в течение 5, 10, 15 и 20 дней) введения масляного раствора эргокальциферола. О скорости биосинтеза белка судили по включению глицина-1-C^{14}, вводимого в дозе 0,5 *микрокюри* на 1 *г* веса тела за 2 *час* до забоя. При этом было выявлено, что однократное введение витамина $Д_2$ в указанных дозах и сроках исследования не вызвало статистически значимых изменений в скорости включения глицина-1-C^{14} в белки названных органов, хотя радиоактивность белковых фракций печени и почки в большинстве случаев оказалась выше контрольного уровня. Нужно отметить, что однократное введение витамина $Д_2$ даже в дозе 45 000 МЕ не вызвало у животных заметных признаков Д-гипервитаминоза в исследованный промежуток времени (2—48 *час*). Это, по-видимому, обусловлено тем, что признаки Д-витаминной интоксикации проявляются в более поздние сроки. Отсутствие выраженных сдвигов в скорости биосинтеза белка после однократного введения даже высоких доз витамина $Д_2$ свидетельствует, что последний, очевидно, не является специфическим регулятором метаболизма белка в названных тканях (Тажибаев, 1971; Сергеев и др., 1973).

Длительное введение витамина $Д_2$ из расчета 15 000, 30 000 и 45 000 МЕ в сутки наряду с выраженными признаками Д-гипервитаминоза вызвало статистически значимые сдвиги ($P < 0{,}05$) в скорости включения меченой аминокислоты в белки гомогенатов печени, почки, тимуса и селезен-

ки и субклеточных фракций печени (табл. 26). Эффект зависел от дозы и длительности применения витамина $Д_2$ и имел выраженную тканевую специфичность. Скорость включения меченой аминокислоты в белки субклеточных фракций печени и гомогенатов почки возрастала в ранние стадии гипервитаминоза и несколько снижалась в более поздние сроки. Величина эффекта оказалась пропорциональной дозе препарата и была максимальной после введения его в суточной дозе 45 000 МЕ. Сдвиги в скорости инкорпорации радиометки в белки были более выраженными в случаях с микросомальной и ядерной фракциями печени по сравнению с митохондриальной фракцией или постмикросомальным супернатантом.

В тимусе и селезенке в отличие от печени и почки длительное введение витамина $Д_2$ в высоких дозах вызвало заметное снижение скорости включения меченой аминокислоты в белки гомогенатов. Мы не выявили стадийности в действии токсических доз витамина $Д_2$ на включение радиоглицина в белки тимуса и селезенки, которая была обнаружена в случаях с печенью и почкой (стимуляция включения в ранние сроки гипервитаминоза и некоторое снижение в более поздние сроки). Ингибирующий эффект витамина на биосинтез белка в тимусе и селезенке оказался пропорциональным дозе препарата и возрастал с увеличением числа дней его применения.

При длительном (5—20 дней) введении витамина $Д_2$ в суточной дозе 1 000 МЕ мы не наблюдали у животных выраженных признаков Д-гипервитаминоза. При этом не было обнаружено также заметных сдвигов в скорости включения глицина-1-C^{14} в белки печени, почек, тимуса и селезенки.

Таким образом, статистически значимые изменения в инкорпорации меченой аминокислоты в белки печени, почки, тимуса и селезенки при введении витамина $Д_2$ интактным крысам возникают только с появлением признаков Д-витаминной интоксикации.

Эти результаты позволяют полагать, что различные виды диспротеинемий и других нарушений в общем белковом обмене, наблюдаемые при рахите или Д-гипервитаминозе, связаны,по-видимому, с патогенезом и развитием заболевания. В частности, наблюдаемые нами сдвиги в биосинтезе белка в печени, почке, тимусе и селезенке при длительном применении высоких доз витамина $Д_2$ опосредованы, очевидно, гиперкальцемией, изменениями структуры биологических мембран и их проницаемости для ионов и метаболитов, функциональной активностью эндокринных желез, образованием токсических соединений типа перекисей липи-

Таблица 26

Включение глицина-1-C^{14} в белки гомогенатов и субклеточных фракций органов крыс после длительного введения витамина $Д_2$ в высоких дозах

Орган и фракция	Суточная доза витамина, МЕ/100 г	Включение глицина-1-C^{14} в белки, % к контролю, после введения витамина в течение 5 дней	10 дней	15 дней	20 дней
1	2	3	4	5	6
Гомогенат печени	1000	99,2±6,1	98,4±0,8	100,7±3,7	102,0±5,8
	15 000	105,5±3,8	117,8±4,4 P<0,05	128,3±5,3 P<0,02	112,5±7,4
	30 000	121,4±4,1 P<0,02	140,9±3,5 P<0,001	129,7±4,6 P<0,01	97,1±3,2
	45 000	135,3±5,3 P<0,01	145,0±4,0 P<0,001	112,6±7,3	91,2±3,8
Ядра печени	1000	96,7±5,7	99,2±7,1	100,0±2,8	102,9±4,7
	15 000	109,7±6,8	121,3±3,5 P<0,02	128,4±4,1 P<0,01	111,5±5,2
	30 000	127,2±4,1 P<0,01	146,3±2,8 P<0,001	129,7±5,2 P<0,02	101,4±7,3
	45 000	138,4±3,9 P<0,001	150,6±5,2 P<0,001	114,5±8,4	91,0±1,8
Митохондрии печени	1000	99,8±2,5	97,0±7,8	99,2±2,7	101,1±9,2
	15 000	107,8±7,2	111,9±5,2	119,4±4,5 P<0,05	108,5±3,8
	30 000	113,2±4,8	125,1±4,7 P<0,02	120,3±3,4 P<0,05	101,9±4,3
	45 000	120,1±4,1 P<0,02	112,7±2,1	110,5±5,7	96,0±5,9
Микросомы печени	1000	101,0±7,8	98,3±6,0	103,3±1,3	105,4±4,7
	15 000	106,1±5,5	119,0±4,2 P<0,05	127,9±5,0 P<0,02	114,5±2,4
	30 000	131,3±4,9 P<0,01	147,9±3,0 P<0,001	124,6±2,8 P<0,01	99,1±6,8
	45 000	159,4±5,5 P<0,001	147,1±3,8 P<0,001	109,7±4,6	88,6±7,1
Супернатант печени	1000	97,5±2,0	99,8±1,6	98,6±7,4	102,0±2,7
	15 000	108,7±6,6	115,1±4,8	121,3±3,3 P<0,02	111,3±3,9
	30 000	122,4±3,8 P<0,02	130,1±5,0 P<0,01	119,4±4,1 P<0,05	97,6±6,2
	45 000	130,4±4,9 P<0,01	145,2±3,7 P<0,001	115,9±6,1	94,1±4,3
Гомогенат почки	1000	95,9±7,0	94,5±6,2	101,3±7,5	99,1±2,1
	15 000	118,0±1,9 P<0,05	119,4±8,1	122,8±5,3 P<0,05	110,7±6,7
	30 000	121,2±3,4 P<0,02	128,9±4,2 P<0,01	113,2±7,8	96,3±5,3
	45 000	132,4±4,6 P<0,01	138,1±2,5 P<0,001	104,6±3,6	72,3±6,2

1	2	3	4	5	6
Гомогенат тимуса	1000	103,1±5,5	103,6±7,8	98,0±4,5	99,1±5,8
	15 000	92,3±1,2	87,2±5,3	75,9±3,7 P<0,02	62,4±0,7 P<0,001
	30 000	77,5±4,0 P<0,02	71,0±4,2 P<0,01	62,7±1,2 P<0,001	51,2±1,2 P<0,001
	45 000	63,9±3,5 P<0,001	57,3±3,3 P<0,001	44,5±0,8 P<0,001	38,2±1,5 P<0,001
Гомогенат селезенки	1000	99,2±8,1	97,1±3,8	100,1±2,9	101,9±4,7
	15 000	97,6±3,5	93,2±5,6	87,3±5,4	74,5±2,1 P<0,05
	30 000	89,7±5,2	87,2±4,9	75,5±4,1 P<0,05	69,7±3,2 P<0,05
	45 000	82,4±4,8 P<0,05	75,9±4,0 P<0,02	68,7±3,3 P<0,01	65,2±2,7 P<0,01

Примечание. Абсолютные значения включения глицина-1-C^{14} в белки контрольных животных приняты за 100%. Каждое значение представляет среднюю величину 4—8 определений. P дано только для статистически значимых изменений ($P < 0,05$).

дов и другими патологическими процессами, развивающимися при Д-витаминной интоксикации. Выраженное снижение биосинтеза белка в тимусе и селезенке является той молекулярной основой, которая отражает резкое падение защитных сил организма при передозировке витамина Д, сопровождающееся дистрофией лимфоидной ткани.

В последующем нами была предпринята попытка изучения скорости обмена белка в различных тканях при Д-гипервитаминозе, вызванном пятидневным введением витамина $Д_2$ в суточной дозе 45 000 МЕ. О скорости биосинтеза и распада белка судили по включению глицина-1-C^{14}, вводимого за 2, 24, 48 и 96 *час* до забоя в хвостовую вену из расчета 0,5 *микрокюри* на 1 *г* веса тела (табл. 27).

Из таблицы видно, что у животных с Д-гипервитаминозом скорость биосинтеза белка в субклеточных фракциях печени и гомогенатах почки, оцениваемая по скорости инкорпорации меченой аминокислоты, вводимой за 2 *час* до забоя, заметно повышена. Данный эффект сохраняется и через 24 *час*. Через 48 и 96 *час* после введения меченого глицина радиоактивность белка у крыс опытной группы значительно снижена. Д-гипервитаминоз вызвал уменьшение скорости включения радиометки в белки гомогенатов тимуса и селезенки во все сроки исследования с максимумом снижения через 96 *час* после введения глицина-1-C^{14}. Результаты этих исследований свидетельствуют о повышении скорости как

Таблица 27

Включение глицина-1-C^{14} в белки органов крыс при гипервитаминозе $Д_2$ в зависимости от времени введения меченого предшественника

Фракция	Включение C^{14} в белки, % к контролю, после введения глицина-1-C^{14} через			
	2 *час*	24 *час*	48 *час*	96 *час*
Гомогенат печени	135±5,3 P<0,01	121±3,9 P<0,02	89±7,1	58±4,1 P<0,001
Ядра печени	138±3,9 P<0,001	119±6,1	80±3,6 P<0,02	50±4,8 P<0,001
Митохондрии печени	120±4,1 P<0,02	117±5,2	95±2,1	62±5,7 P<0,01
Микросомы печени	159±5,5 P<0,001	126±4,0 P<0,01	92±3,5	60±3,5 P<0,001
Супернатант печени	130±4,9 P<0,01	123±4,6 P<0,02	100±6,9	52±2,8 P<0,001
Гомогенат почки	132±4,6 P<0,01	115±5,1	98±5,7	71±4,7 P<0,001
Гомогенат тимуса	62±3,5 P<0,001	60±4,2 P<0,001	58±3,9 P<0,001	49±5,1 P<0,001
Гомогенат селезенки	82±4,8 P<0,05	79±3,7 P<0,01	78±4,0 P<0,01	69±2,7 P<0,01

Примечание. Абсолютные значения включения глицина-1-C^{14} в белки контрольных животных приняты за 100%. Каждое значение представляет среднюю величину 4—8 определений. P дано только для статистически значимых изменений ($P<0,05$).

биосинтеза, так и распада белка в печени и почке, в то время как в тимусе и селезенке наблюдается сниженное образование и усиленный распад белка. Названные сдвиги протекают с преобладанием скорости распада белка. По-видимому, при Д-гипервитаминозе наблюдается усиление процессов катаболизма белка в изученных органах. Эти изменения в биосинтезе белка, очевидно, являются результатом токсического действия витамина Д.

Таким образом, установление того факта, что актиномицин Д, являющийся специфическим ингибитором ДНК-зависимого синтеза РНК, блокирует физиологический эффект витамина Д, привело к предположению о действии данного витамина на уровне генома компетентных клеток. В последующем исследования были направлены на установление взаимосвязи между эффектом витамина Д на кальциевый обмен и метаболизм нуклеиновых кислот и белка в органах-мишенях. При этом было показано, что витамин Д влияет на матричную активность хроматина и стимулирует биосинтез ядерных РНК клеток слизистой тонкого кишечника.

Предварительное применение ингибиторов синтеза нуклеиновых кислот блокировало данный эффект витамина Д. Обнаружено также стимулирующее влияние витамина Д на биосинтез РНК в костной ткани. Кроме того, присутствие витамина Д в инкубационной среде или предварительное введение его животным вызывало определенные сдвиги в некоторых физико-химических свойствах ДНК и ДНП слизистой тонкого кишечника. Эти данные могут свидетельствовать, что влияние витамина Д на уровне генетического аппарата клеток органов-мишеней является одной из ранних стадий в проявлении его физиологического эффекта. Дальнейшим подтверждением этого предположения явились результаты исследований по влиянию витамина Д на метаболизм белка. В частности, было показано, что витамин Д стимулирует образование кальций-связывающего белка, обладающего высоким сродством к ионам кальция и, по-видимому, играющего важную роль в процессах активного транспорта данного минерала. Механизм участия кальций-связывающего белка в метаболизме кальция еще не выяснен и подлежит дальнейшему изучению. Следует отметить также, что витамин Д стимулирует включение меченых аминокислот не только во фракцию кальций-связывающего белка, но и в суммарные мукопротеиды.

Итак, анализ современных данных дает возможность предполагать, что механизм действия витамина Д может быть связан с участием его в регуляции процессов транскрипции и трансляции генетической информации компетентных клеток.

Значительные изменения в обмене белка и нуклеиновых кислот наблюдаются при недостаточном или избыточном поступлении витамина Д в организм. Этим сдвигам может принадлежать важная роль в развитии рахита и гипервитаминоза Д.

Глава IV

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА Д НА АБСОРБЦИЮ КАЛЬЦИЯ В КИШЕЧНИКЕ

Уже в ранних работах по изучению рахита было обнаружено, что данная патология сопровождается повышенной потерей кальция с калом. В последующем попытки были направлены на установление природы этого явления. В 1923 г. (Orr a. oth., 1923) было показано, что при рахите наблюдается снижение абсорбции кальция и фосфатов в кишечнике. Однако затем появились работы (György, 1929), свидетельствующие, что потеря кальция из организма с калом при дефиците витамина Д обусловлена скорее повышенной экскрецией данного минерала в толстый кишечник, чем нарушением его абсорбции в тонком кишечнике. Лишь несколько позднее (Nicolaysen, 1937a, b; Nicolaysen, Eeg-Larsen, 1953) в опытах с изолированным отрезком тонкого кишечника было убедительно показано, что витамин Д повышает абсорбцию кальция в кишечнике. С этих пор стимулирующий эффект витамина Д на всасывание кальция в тонком кишечнике был неоднократно продемонстрирован в опытах на самых различных видах животных и у людей с применением многочисленных методов исследования. Результаты большинства из этих исследований приведены в ряде обзоров и монографий (Бауман, 1968; Nicolaysen, Eeg-Larsen, 1953; Wasserman, 1963; Wasserman, Taylor, 1969).

В настоящее время считается общепринятым, что стимулирующий эффект витамина Д на абсорбцию кальция в кишечнике является одним из основных проявлений его физиологического эффекта. Однако конкретные механизмы и биохимические процессы, ответственные за проявление названного эффекта витамина Д, выяснены еще не полностью. Проблема основывается на определении механизма абсорб-

ции и транспорта кальция в кишечнике и участия витамина Д в данном процессе. В частности, нужно уточнить следующие вопросы: является ли транспорт кальция активным, направленным против градиента концентрации и электрохимического градиента, или пассивным и какова роль витамина Д в этих процессах? Можно выделить следующие возможные варианты участия витамина Д в регуляции транспорта кальция в кишечнике, которые являются в настоящее время предметом интенсивных исследований.

1. Витамин Д повышает проницаемость клеток слизистой кишечника для кальция, что приводит к увеличению пассивной диффузии кальция. Данный эффект может быть обусловлен изменением структуры и функциональной активности клеточных мебран в результате непосредственного воздействия молекулы витамина Д или его метаболитов или сдвигами в образовании специфических структурных компонентов липопротеидных оболочек.

2. Витамин Д стимулирует процесс активного транспорта кальция в кишечнике. Названный эффект может быть обусловлен следующими моментами: а) влиянием витамина Д на биосинтез или активность ферментов, связанных с источником энергии, необходимой для обеспечения системы активного транспорта кальция; б) образованием de novo или активацией предсуществующих компонентов системы транспорта кальция; в) модификацией витамином Д соответствующей организации цитомембран, необходимой для нормального функционирования механизма активного транспорта.

3. Витамин Д стимулирует процессы как пассивной диффузии, так и активного переноса кальция через мембраны клеток слизистой кишечника.

Если учесть, что роль кальция в организме весьма многогранна, а витамин Д является одним из важных биологически активных соединений, ответственных за нормальное усвоение данного минерала, то становится понятным огромный интерес, проявляемый специалистами к выяснению молекулярных механизмов действия витамина Д на абсорбцию кальция в кишечнике.

Физиологический механизм абсорбции кальция в кишечнике

Важное значение в изучении метаболизма кальция имело получение его меченых препаратов в 1940 г. В более ранних исследованиях авторы занимались главным образом балансовым изучением путем определения

количества поступившего с пищей и выделенного с калом и мочой кальция. Появление радиоактивного кальция дало возможность положить начало для проведения более тонких исследований. В частности, стало возможным осуществлять авторадиографические исследования, опыты по изучению транспорта кальция в направлениях от просвета кишечника в кровь и из крови в просвет кишечника, как в условиях in vitro так и in vivo.

Известно, что эпителий желудочно-кишечного тракта менее проницаем для кальция, чем для натрия и калия. Однако скорость транспорта кальция в кишечнике значительно превосходит скорость передвижения других двухвалентных катионов, таких как ионы железа, цинка и марганца. Приблизительно 30% принятого через рот кальция у взрослых людей транспортируется из просвета кишечника в кровь. На всасывание кальция в кишечнике оказывают влияние различия в факторах питания (содержание кальция и других минеральных веществ), в возрасте, в физиологических состояниях (беременность, лактация, период яйцекладки у птиц и др.), в функциональном состоянии абсорбционной способности слизистой желудочно-кишечного тракта и некоторые другие особенности.

Суммируя эти данные, можно сказать, что с увеличением потребности организма в ионах кальция или с уменьшением поступления данного минерала вместе с пищей способность слизистой кишечника к транспорту кальция повышается. Таким образом, сдвиги в скорости транспорта кальция в кишечнике в зависимости от различных условий носят адаптационный характер. Нужно подчеркнуть, однако, что основным определяющим фактором в регуляции транспорта кальция в кишечнике и в проявлении названной адаптации организма к различным условиям является нормальная обеспеченность витамином Д.

Для выяснения роли витамина Д в абсорбции кальция, по-видимому, прежде всего необходимо установление характера транспорта кальция в кишечнике в нормальных физиологических условиях, а именно: представляет ли перенос кальция пассивную диффузию по направлению градиента концентрации или активный процесс. Данные, свидетельствующие о существовании кальциевого насоса в ткани кишечника, были получены еще в 1959 г. в опытах in vitro (Schachter, Rosen, 1959). У крыс изолировали сегмент тонкого кишечника, промывали его холодным физиологическим раствором и выворачивали слизистой наружу. После лигирования одного из концов сегмент наполняли физиологическим раствором и перевязывали другой конец. Приготовленный

таким образом кишечный «мешок» помещали в специальную колбу с физиологическим раствором при 37°. Воздушное пространство состояло из 95% O_2 и 5% CO_2. В начале опыта концентрация радиокальция (Ca^{45}) и нерадиоактивного кальция (4×10^{-4} М) была одинаковой в инкубационных средах, омывающих слизистую (наружная) и серозную (внутренняя) поверхности кишечного «мешка». После инкубации отношение содержания радиокальция (Ca^{45} серозы/Ca^{45} мукозы) было больше 1. На основании этого было сделано заключение, что кальций транспортируется против химического градиента. В последующем в опытах in vitro (Rasmussen, 1959; Dowdle a. oth., 1960; Harrison H. E., Harrison H. C., 1960; Wasserman, 1960; Schachter, 1963) и in vivo (Wasserman a. oth., 1961; Scott, 1965; Krawitt, Schedl, 1968) на различных видах животных (цыплята, крысы, морские свинки, кролики, собаки и др.) было неоднократно показано, что транспорт кальция по направлению от слизистой к серозе является активным процессом, направленным против градиента концентрации и электрохимического градиента.

Транспорт кальция против градиента концентрации наблюдается и в условиях устранения разности потенциала через слизистую кишечника путем применения короткозамкнутой системы.

Имеется несколько сообщений, в которых наличие активного транспорта кальция в кишечнике подвергается сомнению. В частности, Dumont и сотр. (1960) не смогли обнаружить активный перенос кальция при перфузии подвздошной кишки крыс растворами, содержащими различные концентрации кальция. Helbock и сотр. (1966) в опытах in vitro обнаружили, что при условии отсутствия фосфатов скорость передвижения кальция в направлениях от мукозы к серозе и от серозы к мукозе приблизительно одинакова. На основании этого авторы пришли к заключению, что транспорт кальция в кишечнике происходит путем пассивной диффузии. По их мнению, фосфаты, а не кальций, транспортируются против электрохимического градиента. Однако нужно отметить, что эти эксперименты проведены на взрослых крысах с большим весом, а в опытах Dumont и сотр. использована подвздошная кишка. В более ранних работах (Schachter a. oth., 1960) было найдено, что активный транспорт кальция становится менее выраженным с возрастом и труднее обнаруживается в дистальных отделах тонкого кишечника.

Результаты ряда исследований показывают, что повышение концентрации кальция в значительных пределах (от 10^{-6} до 10^{-3} М) не приводит к насыщению системы транспорта кальция по направлению от мукозной поверхности к серозе

слизистой кишечника. Это может свидетельствовать, что в кишечнике действуют механизмы как пассивной диффузии, так и активного транспорта кальция. Вследствие того, что один из этих процессов (пассивная диффузия) практически не насыщается, даже насыщение системы активного переноса может не отразиться на общей картине насыщаемости транспорта кальция в кишечнике.

При проведении опытов in vitro было выявлено, что система активного транспорта кальция локализуется в основном в двенадцатиперстной кишке. Однако результаты опытов in vivo свидетельствуют о наличии активного переноса кальция во всех отделах тонкого кишечника, хотя названный процесс более выражен в двенадцатиперстной кишке. Это может быть результатом как различной эффективности кальциевого насоса в разных отделах тонкого кишечника, так и отражением того, что в условиях in vitro транспорт кальция осуществляется через значительно большую толщу ткани, включая и мышечные слои стенки кишечника, чем в условиях in vivo (Wasserman, Taylor, 1969). В последнем случае ионы кальция проникают лишь через эпителиальные клетки и затем поступают в кровеносные капилляры, локализованные в lamina propria слизистой кишечника. О наличии системы активного транспорта кальция во всех отделах тонкого кишечника у цыплят свидетельствуют результаты недавних исследований (Adams, Norman, 1970), проведенных в условиях in vitro. У многих видов животных эффективность системы активного транспорта кальция при расчете на единицу поверхности кишечника более выражена в двенадцатиперстной кишке по сравнению с тощей и подвздошной кишкой. Однако названный процесс имеет, по-видимому, видовую специфичность. Об этом могут свидетельствовать данные, что у некоторых видов хомяков система активного транспорта кальция наиболее эффективно действует в подвздошном отделе тонкого кишечника (Schachter, 1963).

Как известно, абсорбция стронция в кишечнике во многих отношениях идентична с транспортом кальция. В эксперименте на крысах было показано, что в подвздошной, тощей, двенадцатиперстной, поперечно-ободочной кишках и желудке абсорбируется соответственно 65, 17, 7, 8 и 2% стронция (Cramer, Copp, 1959). В последующем было продемонстрировано, что у крыс абсорбция кальция в различных отделах желудочно-кишечного тракта происходит идентично (Marcus, Lengemann, 1962). Аналогичные данные о транспорте кальция в кишечнике были получены и в опытах на собаках (Cramer, 1965). Результаты этих исследований сви-

детельствуют, что основная часть кальция абсорбируется в подвздошном отделе тонкого кишечника, хотя скорость абсорбции кальция (М абсорбированного Са/ед. времени/ед. длины кишечника) максимальна в двенадцатиперстной кишке. Это обусловлено, по-видимому, различием в протяженности названных отделов тонкого кишечника и тем, что в дистальных отделах скорость передвижения кишечного содержимого несколько замедлена.

Таким образом, исследования показывают, что транспорт кальция в кишечнике происходит путем пассивной диффузии и активного переноса. При пассивной диффузии он осуществляется по направлению градиента концентрации и во многом зависит от содержания свободного кальция в просвете кишечника. Система активного транспорта кальция, действующая преимущественно по направлению от слизистой к серозе, обеспечивает перенос кальция против градиента концентрации и электрохимического градиента и играет существенную роль для достаточного снабжения организма этим минералом при различном содержании его в диете. Рассмотрим значение витамина Д в регуляции названных процессов.

Механизм действия витамина Д на абсорбцию кальция

Эффективность системы активного транспорта кальция в кишечнике оказалась зависимой от обеспеченности организма витамином Д. Это было неоднократно показано у разных видов животных с применением различных методов исследования. В частности, скорость транспорта кальция в кишечнике у рахитичных крыс по направлению от слизистой к серозе была равна скорости передвижения кальция в обратном направлении, в то время как введение витамина $Д_2$ вызвало трехкратное повышение соотношения: транспорт кальция от слизистой к серозе/транспорт кальция от серозы к слизистой (Schachter, Rosen, 1959). После 4—5-недельного содержания животных на диете, лишенной витамина Д, активный перенос кальция заметно снижается, но может быть восстановлен добавлением в пищу витаминов $Д_2$, $Д_3$ или дигидротахистерина, либо облучением животных ультрафиолетовыми лучами (Шахтер, 1961). Исходя из этих данных, автор приходит к заключению, что роль витамина Д в стимуляции всасывания кальция в кишечнике in vivo обусловлена его непосредственным влиянием на механизм активного транспорта кальция. Недавние подробные исследования (Adams, Norman, 1970; Adams a. oth., 1970;

Norman a. oth., 1970; Wong a. oth., 1970), проведенные с кишечником цыплят в условиях in vitro, также свидетельствуют об определяющей роли витамина Д в процессе активного переноса кальция в кишечнике. Авторы обнаружили, что только при условии обеспеченности витамином Д транспорт кальция в кишечнике является активным, катионнаправленным процессом, действующим против электрохимического градиента. У витамин Д-дефицитных цыплят активный перенос кальция в кишечнике не был обнаружен.

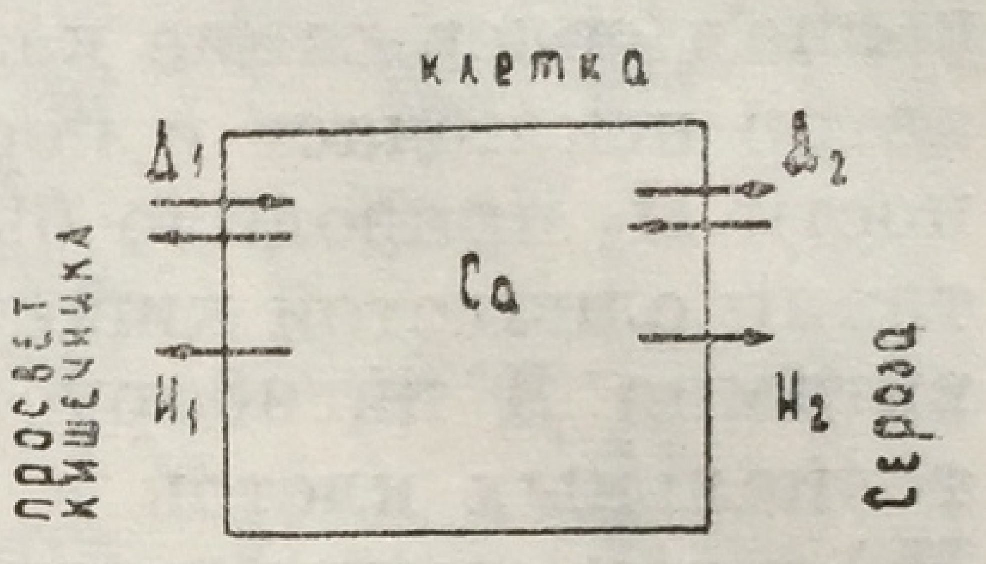


Рис. 8. Схематическое представление процесса транспорта кальция через эпителиальные клетки слизистой тонкого кишечника (Holdsworth, 1965).

Стимулирующий эффект витамина Д на активный транспорт кальция в кишечнике является энергозависимым процессом, связанным с системой окислительного фосфорилирования (Schachter a. oth., 1960, 1961). Об этом свидетельствуют данные, что стимулируемый витамином Д активный транспорт кальция требует присутствия кислорода и обменного субстрата. Азот, низкая температура и метаболические яды подавляют активный транспорт кальция.

Имеются некоторые разногласия относительно того, какие стадии процесса транспорта кальция в кишечнике подвержены действию витамина Д. Для удобства изложения рассмотрим схематическое представление (по Holdsworth, 1965) процесса транспорта кальция через эпителиальную клетку слизистой кишечника (рис. 8). Автор предполагает, что поверхности эпителиальной клетки, обращенные к просвету кишечника и к серозе, содержат однонаправленные энергозависимые кальций-насасывающие системы ($Н_1$, $Н_2$) и в то же время осуществляют двунаправленный диффузионный транспорт ($Д_1$, $Д_2$) кальция. Активный транспорт кальция направлен при этом на снижение внутриклеточной концентрации кальция, поскольку последняя имеет обычно более низкий уровень (Borle, 1967). Следовательно, активный транспорт кальция осуществляется по двум направлениям: из клетки слизистой к просвету кишечника ($Н_1$) и к серозе ($Н_2$). Диффузионный транспорт ($Д_1$, $Д_2$) зависит от состояния проницаемости мембраны, действует преимущественно по направлению градиента концентрации в сторону установления равновесия между внутри- и внеклеточным содержанием кальция.

Holdsworth обнаружил, что транспорт кальция по направлению от слизистой к серозе повышается витамином Д,

и данный эффект витамина блокируется при инкубации ткани кишечника при 0°. Влияние витамина Д на транспорт кальция в обратном направлении не было обнаружено. Стимулирующее влияние витамина на перенос кальция от просвета кишечника к серозе могло быть результатом или повышения активности H_2, или ингибирования H_1, или повышения диффузной проницаемости $Д_1$ и $Д_2$. Автор исключает последнюю возможность, поскольку эффект витамина Д блокировался при низкой температуре, а следовательно, зависел от наличия обменной энергии. Поскольку витамин Д повышал содержание кальция в ткани слизистой кишечника, автор исключает и первую возможность (повышение активности H_2 приводило бы к снижению содержания кальция в ткани слизистой кишечника) и приходит к заключению, что витамин Д ингибирует активный перенос кальция из эпителиальных клеток в просвет кишечника (т. е. ингибирует H_1) и тем самым повышает концентрацию внутриклеточного кальция, что, в конечном итоге, приводит к усилению транспорта кальция от просвета кишечника к серозе.

Ссылаясь на схему Holdsworth (см. рис. 8), можно сказать, что Schachter с сотр. постулируют стимулирующий эффект витамина Д на H_2 (активный транспорт кальция из эпителиальных клеток к серозе). Это заключение основывается, главным образом, на результатах исследований, проведенных следующими методами: 1) определение транспорта кальция по методу вывернутой кишечной петли с измерением конечной концентрации кальция в среде, омывающей мукозную и серозную поверхности кишечника; 2) определение кислородозависимой аккумуляции кальция кишечными срезами. Нужно отметить, что результаты исследований Schachter с сотр. и Holdsworth отражают главным образом конечный эффект действия витамина Д на транспорт кальция и зависимость данного эффекта от присутствия обменной энергии. Эти исследования направлены в основном на обнаружение влияния витамина Д на активный транспорт кальция, в то время как возможность определения эффекта витамина Д на диффузионную проницаемость мембран для кальция сведена здесь к минимуму. Не удивительно поэтому, что в данных исследованиях влияние витамина Д на проницаемость мембран для кальция не было выявлено.

Результаты исследований Harrison и Harrison (1960, 1963, 1965) свидетельствуют, что витамин Д повышает диффузионную проницаемость ($Д_1$ и $Д_2$) клеточных мембран слизистой кишечника для ионов кальция. Эти исследователи придерживаются мнения, что первичное действие витамина Д обусловливает повышение проницаемости слизистой ки-

шечника для кальция, что делает возможным действие системы активного транспорта кальция.

Результаты недавних исследований, проведенных на крысах (Urban, Harold, 1969, 1970), свидетельствуют, что витамин Д оказывает специфическое действие как на диффузионную проницаемость клеточных мембран для ионов кальция, так и на систему активного транспорта кальция (рис. 9). Авторы указывают, что основным в действии витамина Д является повышение транспорта кальция из эпителиальных клеток к серозе. Кроме того, витамин Д снижает транспорт кальция из эпителиальных клеток в просвет кишечника, не оказывая заметного влияния на передвижение кальция в обратном направлении. Повышается также скорость поступления кальция из плазмы в эпителиальные клетки, однако суммарный поток кальция при введении витамина Д рахитичным животным меняется таким образом, что транспорт кальция из полости кишечника к плазме значительно возрастает.

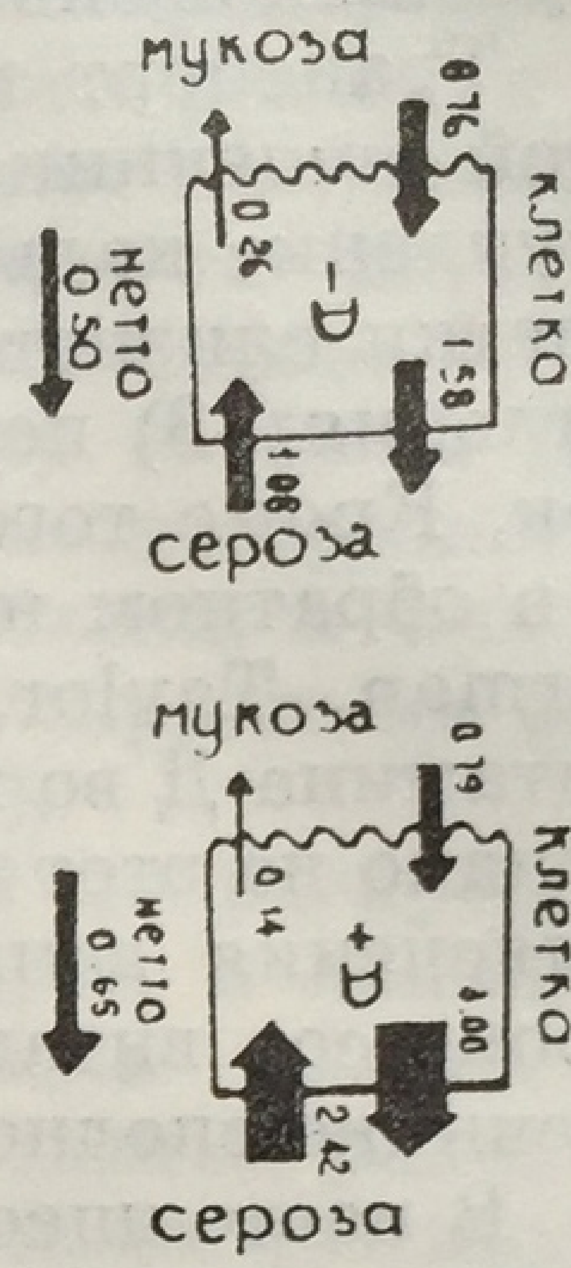


Рис. 9. Схематическое представление влияния витамина Д на транспорт кальция через эпителиальные клетки слизистой двенадцатиперстной кишки (Urban, Harold, 1970).

Wasserman с сотр. (Wasserman, Kallfelz, 1962, Wasserman, 1963; Wasserman a. oth., 1966) в опытах in vivo на цыплятах и крысах показали, что витамин Д повышает проницаемость клеточных мембран слизистой кишечника для кальция не только от полости кишечника к плазме, но и в обратном направлении. Подобный эффект витамина может быть объяснен или повышением диффузионной проницаемости кишечника для кальция, или одновременной стимуляцией системы активного транспорта кальция в обоих направлениях. На основании результатов дополнительных опытов in vitro авторы приходят к заключению, что изменение диффузионной проницаемости действительно имеет место и является, по-видимому, одной из стадий в действии витамина Д на транспорт кальция. В частности, Wasserman и сотр. предполагают, что витамин Д стимулирует также образование белкового компонента системы активного транспорта кальция (см. главу III).

Анализируя изложенное, можно сказать, что витамин Д влияет, очевидно, как на диффузионную проницаемость клеточных мембран слизистой кишечника, так и на систему активного транспорта кальция. Некоторая несогласован-

ность в результатах исследований, полученных разными авторами, является, по-видимому, следствием различий методических подходов и экспериментальных особенностей. Это, в свою очередь, диктует необходимость изучения данного вопроса с применением комплекса методических подходов, дающих возможность оценивать действие витамина Д в разных звеньях системы транспорта кальция.

Транспорт кальция через клеточные структуры слизистой кишечника представляется следующим образом: 1) поступление кальция из полости кишечника в эпителиальные клетки слизистой оболочки; 2) внутриклеточный транспорт кальция; 3) перенос кальция к серозной поверхности клеток. Кроме того, необходимо учитывать транспорт кальция и в обратном направлении. Некоторые исследователи (Wasserman, Taylor, 1969) предполагают возможность участия витамина Д во всех названных стадиях транспорта кальция, однако на этот счет еще нет единого мнения. Необходимость выяснения данных вопросов для изучения биохимических процессов витамин Д-зависимого транспорта кальция в кишечнике вполне очевидна.

В настоящее время еще не полностью выяснено, стимулирует ли витамин Д образование компонентов системы транспорта кальция, или его действие ограничивается модификацией или активацией преформированной системы транспорта кальция в кишечнике. Однако в последние годы многие исследователи придерживаются мнения, что витамин Д стимулирует образование de novo белкового компонента системы транспорта кальция. Большой интерес представляют также данные о влиянии витамина Д на структуру и функциональную активность биологических мембран.

В последние годы появились данные, свидетельствующие, что витамин Д участвует в поддержании нормальной структуры и функциональной активности мембран клеток и клеточных органелл. Поскольку основной ролью витамина Д в кишечнике является регуляция транспорта ионов кальция через клеточные мебраны слизистой кишечника, выяснение механизма подобного взаимодействия представляет несомненный интерес.

В опытах с суспензией эритроцитов (Блажеевич, Спиричев, 1966а) было показано, что присутствие витамина $Д_2$ в условиях in vitro вызывает гемолиз эритроцитов, инкубируемых при 37° в изотонической среде. Степень гемолиза возрастала с повышением концентрации витамина Д и с увеличением продолжительности инкубации. Гемолитическое действие витамина $Д_2$ наблюдалось при 37° и отсутствовало при 5—20°. Авторы приходят к заключению, что в основе

этого эффекта лежит не простое накопление витамина Д в мембранах эритроцитов, а его химическое взаимодействие с компонентами этой мембраны. В более ранних исследованиях было показано, что витамин Д необходим для поддержания нормальной структуры митохондрий (De Luca a. oth., 1960) и что присутствие витамина Д в инкубационной среде вызывает лизис лизосомальных мембран (De Duve a. oth., 1962). Все эти данные косвенно указывают на возможность непосредственного взаимодействия молекулы витамина Д как стероида с липопротеиновыми оболочками. Подобная возможность вполне вероятна, поскольку витамин Д обладает сходной химической структурой с холестерином и стероидными гормонами, которые обнаружены в мембранах клеток и субклеточных структур и регулируют их физико-химические свойства (Сергеев и др., 1971).

Результаты некоторых исследований по распределению витамина Д (см. главу II) свидетельствуют о локализации данного витамина в мембранной фракции клеток и клеточных органелл. В частности, после введения рахитичным животным меченого витамина Д в физиологических количествах значительная часть радиометки гомогената слизистой кишечника локализуется во фракции ядерных мембран (De Luca, 1969b). Результаты авторадиографического изучения субклеточного распределения H^3-витамина $Д_3$ (Moriuchi a. oth., 1967) показывают возможность связывания витамина Д мембранами митохондрий и эндоплазматического ретикулума.

В опытах in vitro с применением метода инфракрасной спектрофотометрии (Zull, Cosimo, 1969) была показана возможность связывания витамина Д яичным лецитином. Ассоциация молекул происходила путем образования водородной связи между гидроксильной группой витамина Д и кислородом неэстерифицированного фосфата яичного лецитина. Каждая молекула витамина Д взаимодействовала с одним атомом кислорода фосфата лецитина. Авторы полагают, что взаимодействие витамина Д и лецитина в клеточных мембранах может оказывать влияние на связывание и транспорт кальция в мембранных системах.

Возможно, что молекулы витамина Д или его метаболитов являются компонентами цитомембран, которые, модифицируя структурную организацию последних, обеспечивают их проницаемость для ионов кальция. Подобное предположение не объясняет латентный период в действии витамина Д и тот факт, что после введения его животным время обнаружения максимальной концентрации витамина Д не согласуется с действием последнего на транспорт кальция в ки-

шечнике. Однако можно допустить, что мембранное действие витамина Д является одной из стадий в процессе стимуляции всасывания кальция в кишечнике. В частности, некоторыми авторами (Zull a. oth., 1966) предполагается, что изменение концентрации внутриклеточного кальция, обусловленное взаимодействием витамина Д с субклеточными мембранами, приводит к инициации процессов, направленных на образование компонентов системы активного транспорта кальция.

Эти немногочисленные литературные данные свидетельствуют о возможности непосредственного взаимодействия молекулы витамина Д (или его метаболитов) с компонентами биологических мембран. Однако в настоящее время эти вопросы изучены недостаточно и не получили должной оценки. Совсем еще не изучено взаимодействие биологически активных метаболитов витамина Д с мембранами. Между тем комплексное исследование влияния витамина Д и его метаболически активных форм на мембранные структуры в условиях организма или в различных модельных системах представляет несомненный интерес в выяснении молекулярного механизма действия витамина Д.

В опытах in vitro (Thompson, De Luca, 1964) было установлено, что добавление витамина Д к пище вызывает у рахитичных крыс трехкратное увеличение включения неорганического P^{32} в фосфолипиды слизистой кишечника. Несколько меньшее стимулирование включения P^{32} наблюдалось в фосфолипиды срезов почек. Стимулирующий эффект витамина Д на включение P^{32} в липиды клеточных ядер, митохондрий и микросом (за исключением микросом печени) слизистой кишечника, почек и печени был обнаружен и в других исследованиях (Hosoya a. oth., 1964). Данный эффект витамина Д зависит от целостности системы окислительного фосфорилирования. Об этом свидетельствует угнетение стимуляции в анаэробных условиях под действием метаболических ингибиторов или холода. Путем фракционирования фосфолипидов методами колоночной и тонкослойной хроматографии было выявлено стимулирующее действие витамина Д на включение P^{32} в лецитин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин и отсутствие его эффекта на метаболизм фосфатидилхолина. В последующем было обнаружено, что витамин Д стимулирует включение DL-серина-3-C^{14} в фосфолипидные фракции митохондриальных мембран (Hosoya a. oth., 1964a, 1970). Названный эффект также оказался чувствительным к действию холода и метаболических ингибиторов.

Недавно (Adams a. oth., 1970) было показано, что очищенные препараты щеточной каймы слизистой тонкого кишечника цыплят содержат различное количество общего липида и холестерина в зависимости от обеспеченности витамином Д, в то время как различия в содержании холесте-

Таблица 28

Содержание холестерина в гомогенатах и очищенных препаратах щеточной каймы слизистой тонкого кишечника витамин Д-дефицитных цыплят и цыплят, леченных витамином Д
(Adams a. oth., 1970)

Д-витаминный статус	Препарат щеточной каймы			Гомогенат
	мг липида/100 *мг* белка	*мг* холестерина/100 *мг* белка	*мг* холестерина/100 *мг* липида	*мг* холестерина/100 *мг* липида
—Д	22,9	1,78	7,80±0,60	4,94±0,00
+Д	19,2	2,08	10,90±0,10	5,06±0,03

Примечание. Витамин $Д_3$ в дозе 500 МЕ вводили витамин Д-дефицитным цыплятам (—Д) за 60 *час* до забоя.

рина в цельных гомогенатах мукозы были незначительными (табл. 28). При этом было отмечено, что при Д-витаминной недостаточности наряду с некоторым повышением общего количества липидов (в расчете на 1 *мг* белка) содержание холестерина в препаратах щеточной каймы значительно снижается. Исходя из этих данных авторы приходят к заключению, что имеются существенные различия в структурной организации мембран микроворсинок слизистой тонкого кишечника у рахитичных и леченных витамином Д цыплят.

Таким образом, витамин Д влияет на метаболизм некоторых компонентов биологических мембран. Последние, являясь структурно-функциональными элементами всех клеток и клеточных органелл, принимают участие во многих метаболических процессах в клетке. Осуществляя регуляцию селективного транспорта ионов, питательных веществ и метаболитов между клеткой и средой, биологические мембраны способствуют физиологическому протеканию многочисленных биохимических реакций. Важность данного вопроса определила огромное количество исследований, направленных на выяснение структуры и функции биологических мембран и механизмов трансмембранного

транспорта веществ. Особый интерес при этом представляет установление регуляторов мембранной проницаемости. С данной точки зрения витамин Д представляется одним из основных регуляторов транспорта кальция через цитомембраны слизистой кишечника.

Согласно теории мембранных структур, предложенной Danielli и Davson (1935), существует общий принцип морфологической организации биологических мембран, состоящих из центрального бимолекулярного слоя липидов с ассоциированными с ними молекулами белка. Результаты современных исследований ультраструктуры клеточных мембран, проведенных методами электронной микроскопии, электронного парамагнитного резонанса, рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса, скалывания замороженных объектов, спин-метки, сканирующей калориметрии и др. можно разделить на две основные группы. Одна из них подтверждает наличие в биологических мембранах непрерывного бимолекулярного липидного слоя, являющегося основой структурной организации клеточных мембран, и белкового компонента. Связь между липидным и белковыми компонентами осуществляется за счет электростатического и гидрофобного структурного взаимодействия. Вторая группа исследователей постулирует субъединичный липопротеиновый принцип организации мембран и отрицает существование непрерывного липидного слоя. Анализ современных представлений об ультраструктуре биологических мембран и их роли в обеспечении функции организма представлены в ряде обзоров и монографий (Трошин, 1956; Боровягин, 1967, 1969, 1971; Давыдова, 1967; Гельман, 1969; Chapman, 1968; Branton, 1969; Hendler, 1971).

Изменения химического состава и структурной организации мембран, межмолекулярного взаимодействия и конформации мембранных субъединиц и различные другие факторы оказывают влияние на функциональную активность биологических мембран. Роль некоторых регуляторов проницаемости липопротеиновых оболочек для ионов и метаболитов может рассматриваться как воздействие на эти факторы. Основная часть липидного компонента многих клеточных мембран приходится на долю фосфолипидов (Боровягин, 1971). Холестерин также является одним из компонентов липопротеиновых мембран. Определенные функциональные свойства биологических мембран находятся в прямой зависимости от структурной организации их липидов. В частности, было показано (Gier a. oth., 1970), что проницаемость модельных и естественных мембран для ионов и различных неэлектролитов зависит от их фосфолипидного

состава (тип фосфолипида, характер цепи жирных кислот, присутствие нейтральных липидов). Холестерин, взаимодействуя с фосфолипидными молекулами, стабилизирует их бислой, ограничивает участие молекул фосфолипидов в метаболических процессах, уменьшает гидрофобную и увеличивает гидрофильные области бислоя. Таким образом, липидный состав мембран во многом определяет их функциональную активность. Можно предполагать, что влияние витамина Д на липидный состав биологических мембран обусловливает такую структурную организацию последних, которая приводит к облегчению транспорта ионов кальция.

На основании данных о стимулирующем влиянии витамина Д на включение меченых предшественников в фосфолипидные фракции цитомембран было выдвинуто предположение (Thompson, De Luca, 1964; Hosoya a. oth., 1970), что витамин Д индуцирует биосинтез ферментов фосфолипидного обмена. В связи с этим представляет интерес, что стимуляция включения P^{32} в фосфолипиды слизистой тонкого кишечника наблюдалась через 3 *час* после введения 2000 МЕ витамина $Д_3$ (Thompson, De Luka, 1964). Следовательно, наблюдается определенная идентичность в продолжительности латентного периода в действии витамина Д на транспорт кальция и фосфолипидный метаболизм в слизистой тонкого кишечника. Дальнейшее изучение названных взаимоотношений представляет несомненный интерес в выяснении мембранного действия витамина Д.

Имеются данные, что фосфолипиды синтезируются в микросомах и в последующем транспортируются в митохондрии. Позднее было показано включение серина и холина в мембранные фосфолипиды митохондрий печени крыс (Bygrave, Bucher, 1968; Bygrave, Kaiser, 1968). Hosoya с соавт. (1970) обнаружили стимулирующее влияние витамина $Д_3$ на инкорпорацию серина-3-C^{14} в фосфолипидные фракции печеночных митохондрий. Исходя из этих данных авторы приходят к предположению, что витамин Д, возможно, участвует в транспорте фосфолипидных предшественников и фосфолипидов из микросом в митохондрии.

Состав и структурная организация белкового компонента липопротеиновых оболочек изучены еще недостаточно. Мембранные белки являются, по-видимому, гетерогенными, а их молекулярные веса колеблются в значительных пределах. В частности, недавно из эритроцитарных мембран было выделено около 14 различных белков с молекулярным весом от 50 000 до 250 000 (Lenard, 1970). Более крупные белковые молекулы легко дезагрегируют до субъединиц с молекулярным весом 20 000 при повышении ионной силы сре-

ды выделения (Berg, 1969). Отметим при этом, что молекулярный вес витамин Д-зависимого кальций-связывающего белка идентичен с молекулярным весом указанных мембранных белков. Возможность взаимодействия кальций-связывающего белка с мембранными структурами и роль его в транспорте кальция обсуждается в главе III.

Как известно, плазматические мембраны включают белки, обладающие АТФ-азной активностью, ферментную систему цепи переноса электронов и ряд других ферментных систем. В последнее время появились сообщения о влиянии витамина Д на некоторые ферменты, относящиеся к мембранным белкам. В частности, было обнаружено (Martin a. oth., 1969) повышение активности кальций-стимулируемой АТФ-азы (аденозинтрифосфатазы) в препаратах щеточной каймы слизистой тонкого кишечника рахитичных крыс после введения им витамина Д. В последующем эти исследования были продолжены рядом авторов (Haussler a. oth., 1970; Holdsworth, 1970; Melancon, De Luca, 1970; Norman a. oth., 1970), которые определили различные факторы, влияющие на данный эффект витамина Д. Стимулируемая витамином Д АТФ-аза оказалась чувствительной к присутствию ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}, но ионы Na^{+} и K^{+} не влияли на ферментативную активность (табл. 29). Оубаин, являющийся специфическим ингибитором транспорта калия и натрия, также не оказывает влияния на чувствительную к витамину Д АТФ-азную активность щеточной каймы слизистой тонкого кишечника как в присутствии, так и в отсутствии ионов кальция (Melancon, De Luca, 1970).

Время повышения АТФ-азной активности после орального или парентерального введения витамина Д оказалось идентичным с величиной латентного периода в действии витамина Д на транспорт кальция в кишечнике. Максимальное повышение АТФ-азной активности и скорости транспорта кальция в кишечнике наблюдались в одинаковое время после введения рахитичным цыплятам витамина Д. Это привело к предположению, что два процесса — повышение АТФ-азной активности и транспорта кальция в кишечнике, обусловленные витамином Д, интимно взаимосвязаны (Melancon, De Luca, 1970).

Возможно, витамин Д путем воздействия на активность или на образование новых молекул АТФ-азы участвует в транспорте кальция. Можно допустить, что АТФ-аза принимает или непосредственное участие в системе транспорта кальция, или обеспечивает необходимой энергией систему активного транспорта кальция. Это предположение интересно сопоставить с тем фактом, что процессы активного выде-

Таблица 29

Влияние различных катионов на стимулируемую витамином Д АТФ-азную активность щеточной каймы слизистой кишечника цыплят (Holdsworth, 1970)

Присутствие катионов в инкубационной среде	Гидролиз АТФ, нМ/*мин*/*мг* белка	
	Рахитичные цыплята	$Д_3$-витаминизированные цыплята (400 МЕ за 16 *час*)
Трис	5	5
Трис + 2 мМ Mg^{2+}	47	85
Трис + 2 мМ Mg^{2+} + + 50 мМ Na^{+}	45	86
Трис + 2 мМ Mg^{2+} + + 15 мМ K^{+}	48	86
Трис + 5 мМ Ca^{2+}	22	45
Трис + 2 мМ Mg^{2+} + + 5 мМ Ca^{2+}	84	127
Трис + 2 мМ Mg^{2+} + + 20 мМ Ca^{2+}	96	142

Примечание. pH инкубационной среды равен 8,5.

ления из клетки ионов натрия и накопления ионов калия зависят от особой АТФ-азы, активируемой ионами магния и катализирующей превращение одной молекулы АТФ в АДФ при переносе каждых двух ионов калия и трех ионов натрия. Данная АТФ-аза, как известно, действительно участвует в активном переносе натрия. Полученные в настоящее время данные о влиянии витамина Д на АТФ-азу еще немногочисленны, что затрудняет наметить более конкретные пути участия данного фермента в процессах транспорта кальция через клеточные мембраны слизистой кишечника.

Имеются также предварительные данные, что влияние витамина Д на АТФ-азную активность слизистой кишечника не связано с действием его на транспорт кальция (Holdsworth, 1970). Это мнение основано на том факте, что стимулирующий эффект витамина Д на транспорт кальция, определяемый по методу вывернутой кишечной петли, не блокируется при добавлении фенилаланина (ингибитор АТФ-азной активности) в среду, омывающую поверхность слизистой кишечника. Однако нужно отметить, что при подобной постановке опыта в условиях сохранения целостности слизистой оболочки кишечника и непродолжительного времени инкубации (30 *мин*) ингибирующий эффект фенилаланина

на АТФ-азу мог не проявиться. О возможности подобной ситуации могут свидетельствовать данные о том, что АТФ-азная активность проявляется только на внутренней, но не на внешней стороне мембраны. Отметим также, что ингибирующий эффект фенилаланина на АТФ-азную активность определялся авторами лишь в изолированных препаратах щеточной каймы слизистой кишечника, где нарушение целостности клеточных мембран и возможность свободного доступа фенилаланина к внутренней поверхности мембран вполне очевидна. Исходя из этих данных можно сказать, что идея участия АТФ-азы в проявлении действия витамина Д на всасывание кальция в кишечнике весьма заманчива и требует дальнейшей более тщательной экспериментальной оценки.

Путем гистохимического исследования было обнаружено, что у крыс при недостаточности витамина Д наблюдается снижение активности щелочной фосфатазы в тонком кишечнике и повышение названного показателя после добавления витамина Д в диету (Cheesman a. oth., 1966). В последующем в связи с обнаружением стимулирующего влияния витамина Д на мембранную АТФ-азную активность клеток слизистой кишечника значительно возрос интерес к изучению влияния витамина Д на активность щелочной фосфатазы, поскольку свойства последней во многом коррелируют с АТФ-азной активностью. Кроме того, щелочной фосфатазой особенно богаты ткани кишечника, почек и костей, т. е. ткани с высоким минеральным (в том числе и кальциевым) обменом (Nagode a. oth., 1966). Наибольшая часть кишечной щелочной фосфатазы локализуется в микроворсинках слизистой оболочки (Padykula, 1962; Forstner a. oth., 1968; Norman a. oth., 1970), а мембраны микроворсинок являются, как известно (Adams a. oth., 1969; Martin, De Luca, 1969), основным местом действия витамина Д на транспорт кальция. Таким образом, сравнение структуры и функционального состояния клеточных мембран микроворсинок слизистой тонкого кишечника у витамин Д-дефицитных и насыщенных витамином Д животных может, очевидно, привести к обнаружению специфических изменений, имеющих отношение к действию витамина Д на активный перенос кальция.

Совсем недавно рядом исследователей было обнаружено, что витамин Д повышает активность щелочной фосфатазы в микроворсинках слизистой тонкого кишечника (Haussler a. oth., 1970; Holdsworth, 1970; Norman a. oth., 1970). Применявшиеся при этом дозы витамина Д (50—500 МЕ) близки к физиологическим, но тем не менее вызвали 2—3-

кратное повышение активности щелочной фосфатазы. Следовательно, можно полагать, что данный эффект витамина Д не является каким-то побочным действием, а, скорее, имеет отношение к проявлению физиологического ответа на введение витамина Д. Подобная возможность подтверждается тем, что после введения витамина Д рахитичным животным наблюдается четкая корреляция между увеличением активности щелочной фосфатазы в микроворсинках и повышением скорости транспорта кальция в кишечнике.

По некоторым данным (Eaton, Moss, 1967), стимулируемые витамином Д Mg^{2+}-АТФ-азная, Ca^{2+}-АТФ-азная активность и щелочная фосфатаза представляет активность одного-единственного фермента (Haussler a. oth., 1970). Для проверки этого предположения авторы определяли влияние различных специфических ингибиторов на ферментативную активность щелочной фосфатазы, Mg^{2+}-АТФ-азы и Ca^{2+}-АТФ-азы. При этом было выявлено, что L-фенилаланин (10 мМ), являющийся стереоспецифическим ингибитором щелочной фосфатазы кишечника (Grosh, Fishman, 1968), оказался ингибитором для Ca^{2+}-АТФ-азы и Mg^{2+}-АТФ-азы и приводил к постепенному снижению их ферментативных активностей. Д-стереоизомер фенилаланина, служивший в этих опытах в качестве контроля, не оказывал влияния ни на одну из трех форм активности. Ионы Be^{2+} и Zn^{2+}, являющиеся ингибиторами щелочной фосфатазы (Thomas, Albridge, 1966), блокировали все три вида активности по аналогии с L-фенилаланином. Другие ионы (Co^{2+}, Fe^{2+}, Sr^{2+} и Ba^{2+}), которые не являются ингибиторами для щелочной фосфатазы, не оказали заметного влияния и на АТФ-азную активность.

На основании этих данных авторы приходят к заключению, что все три тестированные ими формы ферментативной активности (щелочная фосфатаза, Mg^{2+}-АТФ-аза и Ca^{2+}-АТФ-аза) в микроворсинках кишечника обладают свойствами одного белкового фермента. К подобному предположению приходит и Holdsworth (1970) на основании проведенных им идентичных опытов с фенилаланином. Кроме того, щелочная фосфатаза микроворсинок у рахитичных и леченных витамином Д цыплят, как и стимулируемая витамином Д АТФ-аза, оказалась чувствительной к присутствию определенной концентрации ионов Mg^{2+} и Ca^{2+}, в то время как ионы Na^{+} и K^{+} не оказали заметного влияния на его активность (табл. 30).

Одновременное изучение активности щелочной фосфатазы, Mg^{2+}-АТФ-азы и Ca^{+2}-АТФ-азы микроворсинок слизистой оболочки тонкого кишечника у витамин-Д-дефицитных

Таблица 30

Влияние различных катионов на стимулируемую витамином Д активность щелочной фосфатазы щеточной каймы слизистой кишечника цыплят
(Holdsworth, 1970)

Присутствие катионов в инкубационной среде	Гидролиз р-нитрофенилфосфата, нМ/*мин*/*мг* белка	
	Рахитичные цыплята	$Д_3$-витаминизированные цыплята (400 МЕ за 16 *час*)
2 мМ Mg^{2+}	608	834
+ 15 мМ K^{+}	590	798
+ 50 мМ Na^{+}	580	780
+ 15 мМ K^{+} + 50 мМ Na^{+}	620	840
5 мМ Ca^{2+}	15	24
+ 15 мМ K^{+}	38	60
+ 15 мМ K^{+} + 50 мМ Na^{+}	17	28
2 мМ Mg^{2+} + 5 мМ Ca^{2+}	720	944
+ 20 мМ Ca^{2+}	902	1166

Примечание. рН инкубационной среды равен 8,9.

цыплят показало, что все три формы активности повышаются аналогичным образом после введения витамина $Д_3$ (см. табл. 30). Все эти данные приводят к мнению, что повышение названных ферментативных активностей, вызванное введением витамина Д, обусловлено воздействием последнего на один-единственный фермент.

Витамин Д, однако, не влияет на многие другие формы исследованной ферментативной активности, локализующиеся в микроворсинках слизистой кишечника. Так, не обнаружено заметного влияния витамина Д на активность кислой фосфатазы (Holdsworth, 1970), ферментов гликолиза (Sallis, Holdsworth, 1962), цитохромоксидазы и 5'-нуклеотидазы. Введение витамина Д не вызвало заметных сдвигов в активности различных дисахаридаз щеточной каймы слизистой кишечника (табл. 31). Приблизительно одинаковый уровень дисахаридазной активности обнаружен в щеточной кайме слизистой кишечника как у витамин Д-дефицитных, так и у леченных витамином Д цыплят. Следовательно, введение витамина Д не обусловливает неспецифическое изменение активности многих ферментов микроворсинок. Эти данные подчеркивают селективность индукции витамином

Д щелочной фосфатазы и АТФ-азы и снимают возможность, что названный эффект витамина Д обусловлен влиянием последнего на пролиферацию микроворсинок слизистой кишечника.

Предварительное введение актиномицина Д или циклогексимида, ингибирующих различные звенья в системе биосинтеза белка, блокировало стимулирующее влияние витамина Д как на активность щелочной фосфатазы и АТФ-азы, так и на транспорт кальция в кишечнике (Haussler a. oth., 1970; Norman a. oth., 1970). Это может свидетельствовать, что витамин Д влияет не только на активность фермента (или ферментов), но и стимулирует также биосинтез новых ферментных молекул. Возможность подобного предположения подтверждается и тем фактом, что стимулирующий эффект витамина Д на активность щелочной фосфатазы и АТФ-азы в микроворсинках слизистой кишечника обнаруживается лишь через 2—3 *час* после введения витамина Д. Возможно, данный латентный период в действии витамина Д на ферментативную активность обусловлен временем, необходимым для биосинтеза новых молекул белкового фермента.

Таблица 31

Влияние витамина Д на активность дисахаридаз щеточной каймы слизистой кишечника цыплят (Norman a. oth., 1970)

Дисахаридаза	нМ высвобожденной глюкозы/*мин*/*мг* веса щеточной каймы	
	Рахитичные цыплята	$Д_3$-витаминизированные цыплята (500 МЕ за 60 *час*)
Мальтаза	0,078	0,080
Треолаза	0,002	0,002
Целлобиаза	0,003	0,003
Сахараза	0,12	0,103
Лактаза	0,006	0,005

Таким образом, витамин Д через определенный латентный период повышает активность щелочной фосфатазы и АТФ-азы микроворсинок слизистой кишечника и это происходит в близком временно́м соответствии с обусловленной витамином Д стимуляцией транспорта кальция в кишечнике. Оба эффекта ингибируются предварительным применением препаратов, блокирующих белковый синтез. Кроме того, микроворсинки слизистой оболочки являются основным местом действия витамина Д на транспорт кальция в кишечнике. Все это подтверждает предположение, что изменение фосфатазной и АТФ-азной активности в микроворсинках под влиянием витамина Д имеет непосредственное отношение к действию последнего на перенос кальция в кишечнике. По-видимому, названные формы энзиматической актив-

ности, принадлежащие, возможно, одному ферменту и индуцируемые витамином Д, локализуются преимущественно в мембранах микроворсинок слизистой тонкого кишечника.

Недавно было установлено, что витамин Д путем повышения активности аденилциклазы в клеточных мембранах слизистой тонкого кишечника стимулирует образование циклического 3',5'-АМФ (аденозинмонофосфат), который, по-видимому, принимает участие в переносе кальция через клеточную стенку (Neville, Holdsworth, 1969; Holdsworth, 1970). Авторы обнаружили, что введение витамина Д рахитичным цыплятам приводит к повышению активности аденилциклазы в мембранной фракции слизистой тонкого кишечника. Применение циклического 3',5'-АМФ повышало всасывание Ca^{45} в кишечнике и содержание его в кости. В опытах с вывернутой кишечной петлей было выявлено, что у цыплят с рахитом циклический 3',5'-АМФ повышает переход кальция через стенку кишечника в направлении от слизистой к серозе, а у цыплят, получавших витамин Д, этот эффект отсутствует. На основании этих данных авторы приходят к заключению, что циклический 3',5'-АМФ является «вторичным посредником» в действии витамина Д на кишечный транспорт кальция. В связи с этим представляет интерес, что циклический 3',5'-АМФ является посредником в действии многих гормонов (Sutherland a. oth., 1965; Butcher a. oth., 1968). Количество циклического 3',5'-АМФ определяется активностью аденилциклазы, поскольку последняя принимает участие в его образовании. Аденилциклаза является компонентом клеточных мембран (Davoren a. oth., 1963) и, по мнению некоторых исследователей, тесно связана с транспортом ионов через клеточные мембраны. Следовательно, можно ожидать, что дальнейшее изучение влияния витамина Д на аденилциклазу и 3',5'-АМФ расширит наши знания о механизме действия витамина Д на транспорт ионов кальция.

Суммируя изложенное, можно сказать, что витамин Д влияет на пассивную диффузию ионов кальция путем изменения структуры и функциональной активности клеточных мембран и повышает активный транспорт кальция в кишечнике преимущественно по направлению от слизистой к серозе. Последний эффект витамина Д обусловлен, по-видимому, образованием и/или активацией компонентов системы транспорта кальция и воздействием на процессы снабжения энергией системы активного транспорта кальция.

Взаимодействие витамина Д (или его метаболитов) с мембранами клеток и субклеточных структур можно рассматривать как один из наиболее ранних этапов в механиз-

ме его действия. Исследования показывают, что витамин Д обнаруживается в пределах липопротеиновых оболочек. При этом взаимодействие осуществляется, по-видимому, между полярными группировками молекул витамина Д и липидных компонентов цитомембран. Данное взаимодействие играет, очевидно, определенную роль в транспорте витамина Д через клеточные и субклеточные мембраны. Возможно, непосредственное взаимодействие молекулы витамина Д с мембранными структурами приводит к изменению проницаемости мембран для некоторых ионов и метаболитов, однако роль данного процесса в транспорте кальция через клеточные мембраны слизитой кишечника еще не выяснена.

Другим важным аспектом в действии витамина Д на мембранную проницаемость для ионов кальция является регулирующая роль витамина Д в обмене некоторых структурных компонентов липопротеиновых оболочек. В частности, было показано, что витамин Д влияет на метаболизм как липидного, так и белкового компонентов мембран. Современные представления о взаимодействии между структурой и функциональной активностью биологических мембран дают возможность полагать, что регуляция витамином Д структурной организации клеточных мембран слизистой кишечника интимно взаимосвязана с физиологическим действием его на трансмембранный транспорт кальция. Об этом же свидетельствуют данные, что в структурной организации клеточных мембран слизистой кишечника, равно как и в транспорте кальция в кишечнике, имеются существенные различия у витамин Д-дефицитных и леченных витамином Д животных. На основании изложенных экспериментальных данных о влиянии витамина Д на структурные компоненты мембран можно высказать следующие соображения о роли данных процессов в механизме транспорта кальция в кишечнике.

1. Витамин Д регулирует образование некоторых липидных компонентов (фосфолипиды, холестерин) мембран и содержание их в клеточных мембранах слизистой кишечника. Подобное воздействие витамина Д, возможно, приводит к изменению пассивной диффузии ионов кальция или делает возможным нормальное функционирование системы активного транспорта кальция. По-видимому, витамин Д оказывает влияние на образование фосфолипидов путем изменения биосинтеза ферментов фосфолипидного обмена, т. е. воздействует на уровне белкового синтеза.

2. Витамин Д стимулирует биосинтез новых молекул транспортных белков-ферментов, непосредственно участву-

ющих в переносе кальция через мембраны микроворсинок слизистой кишечника.

3. Витамин Д влияет на структурный состав или изменяет конформационные свойства белкового компонента эпителиальных клеток слизистой кишечника и тем самым приводит к изменению их проницаемости для ионов кальция. Влияние витамина Д на биосинтез белкового компонента системы транспорта кальция осуществляется, по-видимому, на уровне транскрипции и трансляции генетического материала.

4. Витамин Д влияет на ферментативную активность в микроворсинках слизистой кишечника.

Глава V

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА Д НА МЕТАБОЛИЗМ КОСТНОЙ ТКАНИ

Как известно, рахит характеризуется выраженными костными нарушениями, в связи с чем выяснение роли витамина Д в развитии названных сдвигов, равно как и изучение механизма его действия на метаболизм костной ткани, представляет вопрос чрезвычайной важности. Выраженные сдвиги в обмене костной ткани наблюдаются не только при недостаточном, но и при избыточном поступлении витамина Д в организм. Так, если рахит классически определяется как недостаточность кальцификации и минерализации гипертрофированных хрящевых зон и остеоида с последующим удлинением и расширением хрящевых пластинок, вызванными Д-витаминной недостаточностью, то при гипервитаминозе Д наряду с усиленной минерализацией вновь образованной кости наблюдается резорбция предобразованной костной ткани.

Однако до сих пор нет еще однозначного ответа на вопросы, принимает ли витамин Д непосредственное участие в минерализации или резорбции костной ткани, или метаболизм последней регулируется витамином Д косвенно, посредством его действия на абсорбцию кальция в кишечнике. Следовательно, если действие витамина Д на транспорт кальция в кишечнике можно считать установленным фактом, то вопрос о прямом участии витамина Д в обмене костной ткани является дискутабельным. Результаты исследований в этом направлении пока лишь дают возможность высказать некоторые гипотезы о механизмах действия витамина Д на костную ткань и создают определенные перспективы в выяснении данного вопроса.

Результаты многочисленных клинических и экспериментальных исследований свидетельствуют, что классиче-

ский витамин Д-недостаточный рахит характеризуется отрицательным балансом основных минеральных компонентов костной ткани — солей кальция и фосфора, и уменьшением содержания последних в крови. Для развития нормальной минерализации костной ткани важно не только определенное содержание кальция и фосфора в крови и интерстициальной жидкости, омывающей костные клетки, но и величина произведения концентрации этих минералов. Так, если величина этого произведения (при условии выражения концентрации кальция и фосфора в *мг*%) ниже 40, то нарушается нормальная минерализация скелета вплоть до прекращения осаждения минеральных солей (Shipley a. oth., 1925), что приводит к развитию рахита. Введение фосфатов рахитичным крысам, содержавшимся на низкокальциевой диете и, соответственно, с низким содержанием этого минерала в крови, приводит к быстрому повышению концентрации фосфора и константы ($Ca \times P$) в крови. Гистологические признаки рахита исчезают при этом в течение нескольких дней. Внутривенное введение кальция (Cossismos a. oth., 1963) или фосфатов (Fraser a. oth., 1958; Steendijk, 1961) детям, больным рахитом, также приводит к повышению константы ($Ca \times P$) и постепенной нормализации рентгенологических показателей костных нарушений. Суммируя результаты этих исследований, можно прийти к следующим заключениям:

1) для нормального обызвествления кости необходим определенный минимум концентрации кальция и фосфора и величины произведения концентрации этих минералов в крови и интерстициальной жидкости, омывающей костные клетки;

2) стимулирующая роль витамина Д в минерализации кости может заключаться в регуляции оптимального содержания кальция и фосфора в плазме и внеклеточной жидкости, что необходимо для нормального обызвествления костной ткани.

В настоящее время многие исследователи придерживаются мнения о «монофункции» витамина Д, а именно, что физиологическая роль последнего в организме определяется главным образом влиянием его на кинетику абсорбционных процессов в кишечнике, в то время как все другие функции витамина Д являются следствием названного эффекта. Предполагается, что витамин Д, стимулируя абсорбцию кальция и вторично фосфатов в кишечнике, поддерживает концентрацию этих минералов в плазме в пределах, оптимальных для нормального обызвествления костной ткани,

чем и определяется роль витамина Д как стимулятора процессов костной минерализации (Nicolaisen, Jansen, 1939; Schachter, Rosen, 1959; Dowadle a. oth., 1960; Wasserman, 1963; De Luca, 1967).

Регуляция витамином Д уровня сывороточного кальция и фосфора, по-видимому, играет не единственную роль в стимулирующем влиянии данного витамина на минерализацию костной ткани. Так, в сыворотке нормальных крыс был обнаружен какой-то еще не идентифицированный фактор, зависимый от витамина Д и стимулирующий поглощение кальция костной тканью (Wells, Gambal, 1968). Этот фактор отсутствовал в сыворотке Д-авитаминозных крыс. Присутствие в инкубационной среде из Кребс-Рингеровского раствора 0,5 *мл* нормальной сыворотки увеличивало поглощение кальция костью, в то время как добавление сыворотки Д-авитаминозных животных или витамина Д в среду не вызвало подобного эффекта. Следовательно, витамин Д-зависимый сывороточный фактор, стимулирующий поглощение кальция костной тканью, не является витамином Д или его метаболитом, а скорее представляет собой специфическое вещество, возможно, белковой природы, образование которого индуцируется витамином Д.

Заслуживают внимания полученные недавно данные о непосредственном влиянии витамина Д на кальцификацию костной ткани (Шубина, 1970; Шубина, Вендт, 1970). Авторами обнаружено прямое стимулирующее влияние витамина $Д_3$ на процесс поглощения кальция костной тканью цыплят в опытах in vitro. При этом показана зависимость эффекта витамина $Д_3$ от его концентрации в среде и существование концентрационного оптимума действия витамина $Д_3$. Инкубация витамина $Д_3$ с костной тканью приводила к образованию соединения с максимумом поглощения при 261—265 *нм* в ультрафиолетовой области спектра, которое обладало равной с витамином $Д_3$ антирахитической активностью. В отличие от витамина $Д_3$ витамин $Д_2$ не оказывал влияния на кальцификацию костной ткани цыплят в опытах in vitro. Однако вещество, полученное после инкубации витамина $Д_2$ с тонким кишечником цыплят, в некоторой степени стимулировало поглощение кальция костной тканью в опытах in vitro. Возможно, эти данные отражают разную чувствительность цыплят к витаминам $Д_2$ и $Д_3$.

Таким образом, витамин Д не только стимулирует всасывание кальция в кишечнике, но, по-видимому, оказывает также влияние на процессы минерализации костной ткани. Однако механизм подобного действия витамина Д еще не ясен.

Имеются многочисленные литературные данные, свидетельствующие, что витамин Д при введении его животным в больших дозах стимулирует мобилизацию костного минерала (Carlsson, 1951, 1954; Nicolaysen, Eeg-Larsen, 1953). Авторы показали, что витамин Д, введенный животным, содержавшимся на витамин Д-дефицитной низкокальциевой диете, повышает резорбцию костного минерала, о чем судили по повышению уровня кальция в сыворотке крови. Подобный эффект могут оказывать не только фармакологические, но и физиологические дозы витамина Д (Carlsson, 1952). Хотя эти данные в последующем оспаривались (Migikovsky, 1957), в настоящее время, по-видимому, уже не вызывает сомнения факт, что витамин Д прямо или косвенно участвует в регуляции процессов мобилизации костного минерала.

Стимулирующая роль витамина Д в процессах костной резорбции проявляется, по-видимому, после преобразования молекулы витамина Д в биологически активный метаболит (или метаболиты). Об этом свидетельствуют данные, что 25-оксиметаболиты витаминов $Д_2$, $Д_3$ и дигидротахистерина$_3$ (соответственно 25-оксиэргокальциферол, 25-оксихолекальциферол и 25-оксидигидротахистерин$_3$) являются более активными и действуют быстрее, чем сами витамины, в мобилизации костного минерала как при введении их в условиях in vivo, так и в условиях in vitro (Blunt a. oth., 1968; De Luca, 1969; Suda a. oth., 1970; Trummel a. oth., 1971). Представляет интерес, что 21, 25-диоксихолекальциферол (метаболит витамина $Д_3$) проявляет высокую избирательную активность в отношении стимуляции резорбции костного минерала, но значительно менее активен в инициации абсорбции кальция в кишечнике (Suda a. oth., 1970), в то время как 25, 26-диоксихолекальциферол оказался неактивным в мобилизации минеральных веществ из костной ткани, но стимулировал транспорт кальция в кишечнике (Suda a. oth., 1970a). При сравнительной оценке эффекта 25-оксихолекальциферола и 1,25-диоксихолекальциферола в мобилизации минеральных компонентов кости крыс, находившихся на рационе, дефицитном по витамину Д и Ca, было обнаружено, что в первые часы после введения диоксиметаболита повышение концентрации сывороточного кальция (следовательно, и резорбции костного минерала) происходило с несколько большей скоростью, чем после введения оксиметаболита витамина $Д_3$ (Tanaka, De Luca, 1971).

Таким образом, наблюдается некоторая идентичность в действии витамина Д на кишечник и костную ткань: наличие латентного периода между введением витамина и на-

чалом проявления эффекта; трансформация молекулы витамина в биологически активные метаболиты до наблюдаемого физиологического ответа. Исходя из этих данных можно предположить, что механизм действия витамина Д на костную ткань может быть связан с влиянием на синтетические процессы биологически активных метаболитов, образующихся в организме из витамина Д. Это предположение в некоторой степени подтверждается тем, что около 77% радиоактивности ядерной фракции костных клеток рахитичных цыплят после введения им меченого витамина $Д_3$ приходится на долю 1,25-диоксихолекальциферола (Weber a. oth., 1971), а применение актиномицина Д в дозе 0,5 *мкг/г* веса тела за 2 *час* до введения животным 25-оксихолекальциферола или 1,25-диоксихолекальциферола подавляет их действие на мобилизацию кальция (Tanaka, De Luca, 1971). Кроме того, появились данные о стимулирующем влиянии витамина Д на биосинтез РНК, белка и полисахаридов в костной ткани рахитичных крыс (Mankin, Lippiello, 1969).

В последние годы опубликованы сведения о влиянии витамина Д на органические компоненты костной ткани. Эти данные свидетельствуют главным образом об изменении обмена белков и ферментов, органических кислот, мукополисахаридов и липидных компонентов костной ткани как при недостаточном, так и при избыточном поступлении витамина Д в организм. Эти сдвиги, несомненно, могут оказывать влияние на метаболизм минеральных компонентов костной ткани.

При Д-витаминной недостаточности наблюдается снижение содержания лимонной кислоты в кости, в то время как введение витамина Д рахитичным животным приводит к повышению содержания цитратов и минеральных солей в костной ткани. Можно предполагать, что увеличение концентрации лимонной кислоты в кости при введении витамина Д, с одной стороны, повышает степень фиксации солей кальция в костной ткани и тем самым способствует ее минерализации. С другой стороны, поскольку лимонная кислота образует с кальцием растворимый комплекс, можно ожидать, что увеличение концентрации цитратов в костях способствует растворению минерального компонента и мобилизации кальция из кости в кровь. Однако до сих пор не выяснена роль лимонной кислоты в проявлении действия витамина Д на метаболизм костной ткани и роль витамина Д в обмене цитратов.

Известно, что более 90% органического матрикса костной ткани составляет фибриллярный белок коллаген (Posner, 1969). Коллагеновые фибриллы образуются до форми-

рования кристаллов минеральных солей и оказывают влияние на их ориентацию. Волокна коллагена, полимеризованные высокоспецифичным образом в продольном и поперечном направлениях, действуют как катализаторы образования центров кристаллизации костного материала. В связи с этим представляет интерес, что при Д-витаминной недостаточности наряду с нарушением процессов кальцификации наблюдается замедление биосинтеза и созревания коллагена, а введение витамина Д рахитичным крысам приводит к усилению биосинтеза коллагена (Morava a. oth., 1971).

Другим важным компонентом костной ткани, имеющим весьма важное значение в процессе обызвествления, являются, по-видимому, мукополисахариды (Касавина и др., 1970; Kobayashi, 1971). Последние в наибольшем количестве содержатся в зонах кальцификации как в норме, так и при рахите. При экспериментальной Д-витаминной недостаточности наблюдаются значительные сдвиги в обмене мукополисахаридов (Hiertguist, 1964a, b). Значительное увеличение мукополисахаридов в костной ткани при рахите связано, по-видимому, с процессом хондрофикации костей.

Костный матрикс, как известно, содержит значительное количество липидов. Кроме того, полученные к настоящему времени экспериментальные данные дают возможность предполагать, что липидам может принадлежать важная роль в процессах кальцификации костной ткани. В связи с этим в последние годы рядом исследователей начато изучение влияния витамина Д на метаболизм липидов, направленное на выяснение механизма действия витамина Д на обмен костной ткани. Было показано, что содержание жира и витамина Д в диете растущих белых крыс оказывает заметное влияние на состояние костной ткани (Голиков, 1967), а экспериментальный фосфат-дефицитный рахит у крыс сопровождается усилением скорости включения C^{14}-пальмитата в липиды срезов эпифизарного хряща; при этом биосинтез триглицеридов и фосфолипидов возрастал в 4 раза по сравнению с контролем (Havivi, Bernstein, 1969). У крыс с Д-витаминной недостаточностью, содержавшихся на диете с адекватным количеством кальция (0,8%) и фосфора (0,4%), существенных изменений в содержании общих и отдельных фракций фосфолипидов в эпифизе и метафизе большеберцовой кости не было обнаружено, в то время как концентрация фосфолипидов в диафизе значительно возрастала. При этом увеличивалось количество общих липидов, триглицеридов и жирных кислот в эпифизе и диафизе при уменьшении их концентраций в метафизе и увеличении со-

держания холестерина в диафизе (табл. 32)(Cruess, Clark, 1971). Исходя из этих данных можно сказать, что не только обеспеченность организма витамином Д, но и состояние минерального обмена оказывает определенное влияние на

Таблица 32

Влияние недостаточности витамина Д на содержание липидов (M±m) в костной ткани крыс
(Cruess, Clark, 1971)

Липиды, *мг/г* органической фракции	Кость	Контроль	Недостаточность витамина Д
Общие липиды	Эпифиз	83,9 ±6,1 (10)	12,0 ±10* (10)
	Метафиз	71,1 ±7,2 (9)	51,2 ±4,6* (10)
	Диафиз	7,62±0,92 (10)	16,4 ±1,4* (10)
Фосфолипиды	Эпифиз	7,90±0,44 (10)	8,66±0,32 (10)
	Метафиз	9,49±0,69 (10)	9,75±0,59 (10)
	Диафиз	1,56±0,14 (10)	2,38±0,16*(10)
Холестерин	Эпифиз	3,13±0,21 (9)	3,14±0,20 (9)
	Метафиз	2,93±0,25 (9)	3,25±0,36 (9)
	Диафиз	0,484±0,048(8)	0,917±0,100*(9)
Общие жирные кислоты	Эпифиз	22,41±2,67 (10)	24,93±2,56 (9)
	Метафиз	17,19±2,68 (9)	9,84±0,77**(10)
	Диафиз	1,77±0,30 (9)	2,68±0,27**(10)
Триглицериды	Эпифиз	2,33 ±0,10 (9)	2,77 ±0,21 (9)
	Метафиз	1,57 ±0,16 (8)	1,06 ±0,12**(10)
	Диафиз	0,181±0,020(8)	0,676±0,073*(10)

Примечание. Животные опытной группы содержались на витамин Д-дефицитной диете в течение 4 недель. * $P<0,01$; ** $P<0,05$. В скобках указано количество животных.

метаболизм липидов в костной ткани. Полученные результаты, по мнению авторов, могут указывать на некоторую задержку превращения нейтральных липидов в фосфолипиды при недостаточности витамина Д. Однако данный эффект, по-видимому, не является первичным.

Избыточное поступление витамина Д в организм, как и при Д-витаминной недостаточности, приводит к значительным сдвигам в обмене липидов в костной ткани. Так, при длительном введении крысам эргокальциферола в дозе 30 000 МЕ (табл. 33) наблюдается увеличение содержания общих липидов, триглицеридов, фосфолипидов, общих и

Таблица 33

Влияние длительного введения витаминов А и Д$_2$ на содержание липидов в костной ткани
(Cruess, Clark, 1965)

Липиды	Контроль			Витамин А			Витамин Д$_2$			Витамины А и Д$_2$		
	мг/г	% от органической фракции	% от общих липидов	*мг/г*	% от органической фракции	% от общих липидов	*мг/г*	% от органической фракции	% от общих липидов	*мг/г*	% от органической фракции	% от общих липидов
Общие липиды	9,60	2,96	—	11,47	3,77	—	18,80*	4,58*	—	16,63	4,77	—
Фосфолипиды	1,54	0,46	16,4	1,93	0,63	17,2	4,42*	1,07*	23,8	2,85	0,81	18,4
Общие жирные кислоты	4,21	1,39	44,3	4,09**	1,35	37,1**	9,71*	2,37*	53,3	6,75	1,94	40,7
Свободные жирные кислоты	2,21	0,69	24,0	2,11	0,70	19,4	4,15***	1,07	25,1	2,73	0,73	18,5
Триглицериды	1,05	0,21	10,9	0,99	0,32	8,7	2,13*	0,52**	11,6	1,55	0,44	9,4
Общий холестерин	0,51	0,15	5,3	0,52	0,17	4,7	0,87*	0,22	4,9	0,80	0,23	5,1
Свободный холестерин	0,17	0,05	1,9	0,24	0,08	2,1	0,32	0,08	1,7	0,27	0,08	1,9

Примечание. Животным в течение 44 дней вводили желудочным зондом витамин Д$_2$ (30000 МЕ) и/или витамин А (15 000 МЕ). *$P<0{,}001$; **$P<0{,}01$; ***$P<0{,}025$.

Таблица 33

Влияние длительного введения витаминов А и $Д_2$ на содержание липидов в костной ткани
(Cruess, Clark, 1965)

Липиды	Контроль			Витамин А			Витамин $Д_2$			Витамины А и $Д_2$		
	мг/г	% от органической фракции	% от общих липидов	*мг/г*	% от органической фракции	% от общих липидов	*мг/г*	% от органической фракции	% от общих липидов	*мг/г*	% от органической фракции	% от общих липидов
Общие липиды	9,60	2,96	—	11,47	3,77	—	18,80*	4,58*	—	16,63	4,77	—
Фосфолипиды	1,54	0,46	16,4	1,93	0,63	17,2	4,42*	1,07*	23,8	2,85	0,81	18,4
Общие жирные кислоты	4,21	1,39	44,3	4,09**	1,35	37,1**	9,71*	2,37*	53,3	6,75	1,94	40,7
Свободные жирные кислоты	2,21	0,69	24,0	2,11	0,70	19,4	4,15***	1,07	25,1	2,73	0,73	18,5
Триглицериды	1,05	0,21	10,9	0,99	0,32	8,7	2,13*	0,52**	11,6	1,55	0,44	9,4
Общий холестерин	0,51	0,15	5,3	0,52	0,17	4,7	0,87*	0,22	4,9	0,80	0,23	5,1
Свободный холестерин	0,17	0,05	1,9	0,24	0,08	2,1	0,32	0,08	1,7	0,27	0,08	1,9

Примечание. Животным в течение 44 дней вводили желудочным зондом витамин $Д_2$ (30000 МЕ) и/или витамин А (15 000 МЕ). $^*P<0,001$; $^{**}P<0,01$; $^{***}P<0,025$.

свободных жирных кислот и холестерина в костной ткани (Cruess, Clark, 1965). Наибольшие сдвиги обнаружены при этом во фракции фосфолипидов. Наряду с увеличением содержания фосфолипидов в костях при гипервитаминозе Д наблюдается повышение скорости включения P^{32} в фосфолипиды (Cruess, Clark, 1967). При этом не было выявлено избирательного действия витамина Д на метаболизм отдельных фракций фосфолипидов (лецитин, лизолецитин, сфингомиелин и фосфатидилэтаноламин). Количество всех указанных фракций фосфолипидов увеличивалось приблизительно в равной степени. Повышение скорости включения P^{32} в фосфолипиды, по мнению авторов, указывает на то, что при гипервитаминозе Д увеличивается биосинтез фосфолипидов. Представляет интерес, что при одновременном применении высоких доз витаминов А и Д названные сдвиги в обмене костных липидов проявляются в значительно меньшей степени (Cruess, Clark, 1965).

Таким образом, недостаточное или избыточное поступление витамина Д в организм приводит к выраженным изменениям в обмене липидов костной ткани. Возможно, что эти сдвиги в некоторой степени ответственны за нарушение процесса окостенения при рахите и гипервитаминозе Д, поскольку предполагается, что липиды принимают участие в процессах кальцификации костной ткани. Однако механизм действия витамина Д на метаболизм липидов, равно как и роль липидов в обызвествлении костей, не выяснен.

В образовании остеоида и резорбции кости, как известно, важная роль принадлежит клеточным элементам костной ткани — остеобластам и остеокластам. Первые содержат много нуклеиновых кислот, обладают интенсивной синтетической деятельностью и, по-видимому, являются в значительной мере ответственными за биосинтез органического матрикса. Остеокласты, синтезируя соответствующие ферменты, принимают активное участие в резорбции костной ткани. Однако механизм регуляции костной резорбции и костеобразовательного процесса является сложным и до сих пор не выяснен.

Витамин Д можно рассматривать в качестве регулятора названных процессов. В связи с этим представляют интерес данные, свидетельствующие, что у крысят, содержащихся на диете без витамина Д, остеобластическое образование матрикса снижается на 20%, а остеокластическая резорбция костной ткани повышается на 80% по сравнению с контрольными животными (Baylink a. oth., 1970). Одновременно наблюдалось двукратное снижение скорости созревания остеоида и начальной минерализации. По мнению авторов,

эти нарушения обусловлены замедлением скорости образования костного матрикса и ускорением рассасывания кости на единицу образующейся или рассасывающейся поверхности, а не изменением площади этих поверхностей. Варьирование скорости образования и минерализации костного матрикса коррелирует со снижением концентрации кальция в сыворотке крови при недостаточности витамина Д.

В нормальных условиях у людей существует положительная линейная корреляция между объемом остеоида и поверхностью костных трабекул, покрытых остеобластами. При Д-витаминной недостаточности наблюдается неадекватное увеличение объема остеоида по отношению к числу остеобластов, что приводит к дефекту в минерализации костной ткани. Введение витамина Д при этом нормализует объем остеоида и числа остеобластов и тем самым способствует нормальной минерализации кости (Fisher a. oth., 1970).

При Д-витаминной недостаточности у людей (Fischer a. oth., 1970) и экспериментальных животных (Baylink a. oth., 1970) наблюдается усиление скорости остеокластической резорбции костной ткани, что, по-видимому, направлено на повышенную мобилизацию костного минерала и соответственно на нормализацию пониженного уровня кальция и/или фосфора в сыворотке крови. Однако в силу недостаточного содержания минеральных веществ в костной ткани и замедления всасывания кальция в кишечнике при Д-витаминной недостаточности усиленная остеокластическая резорбция кости не всегда приводит к нормализации концентрации сывороточного кальция и фосфора.

Механизм действия регуляторов образования и резорбции кости, по-видимому, может быть в значительной степени связан с воздействием на активность различных ферментов, локализующихся в костной ткани. Так, было показано, что паратиреоидный гормон активирует аденилциклазу (Chase, Aurbach, 1968a, b). Предполагается, что этот эффект гормона приводит к ускорению превращения аденозинтрифосфата в циклический 3',5'-аденозинмонофосфат, способствующий, в свою очередь, синтезу и высвобождению специфических лизосомальных ферментов (Wells, Lloid, 1968), которые, по-видимому, индуцируют костную резорбцию (Vaes, 1968). Последнее подтверждается тем, что в опытах in vitro добавление паратиреоидного гормона или экстракта из околощитовидных желез к культуре костной ткани приводит к быстрому ее рассасыванию, о чем свидетельствует прогрессирующее нарастание в среде кальция, фосфора и оксипролина. Повышенная резорбция костной ткани сопровождалась при этом высвобождением значительных количеств лизосо-

мальных гидролаз (β-глюкуронидазы, N-ацетил-β-глюкозаминидазы, β-галактозидазы, кислой дезоксирибонуклеазы, кислой n-нитрофенилфосфатазы и катепсинов), которые, вероятно, индуцируют костную резорбцию, в то время как щелочная фосфатаза, локализующаяся главным образом в местах усиленного костеобразования (Wergedal, Baylink, 1969), отсутствовала в инкубационной среде (Vaes, 1968). При этом показано наличие прямой зависимости между высвобождением лизосомальных гидролаз и выраженностью рассасывания костной ткани.

Тиреокальцитонин тормозит стимулированную паратиреоидным гормоном костную резорбцию (Hirsch, Munson, 1969). Предполагается, что противоположное эффекту паратиреоидного гормона действие тиреокальцитонина связано с активирующим влиянием последнего на фосфодиэстеразу (Wells, Lloid, 1968), разрушающую путем гидролиза циклический 3',5'-аденозинмонофосфат, образование которого, как было отмечено выше, ускоряется при воздействии паратиреоидного гормона на аденилциклазу.

В связи с изложенным выше интересен тот факт, что присутствие витамина Д в условиях in vitro наряду с ускорением костной резорбции (Trummel a. oth., 1969) вызывает освобождение лизосомальных ферментов из костной ткани (De Duve a. oth., 1962).

При Д-витаминной недостаточности у цыплят в хряще и в новообразованной кости значительно снижается активность многих лизосомальных ферментов — α- и β-Д-глюкозидаз, α- и β-Д-галактозидаз, β-Д-глюкуронидазы и гиалуронидазы (Havivi, 1971). Однако имеются данные, свидетельствующие, что на активность лизосомальных ферментов оказывает влияние не только обеспеченность организма витамином Д, но и такие факторы, как содержание кальция и фосфора в диете и сыворотке крови, функциональное состояние желез, продуцирующих паратиреоидный гормон и тиреокальцитонин (Wergedal, 1969; Wergedal, Baylink, 1969, 1971; Wergedal a. oth., 1970). Эти же факторы оказывают влияние на костную резорбцию (Au, Raisz, 1965; Rasmussen a. oth., 1967 ;Raisz, Niemann, 1969; Stauffer a. oth., 1969). Предполагается, что гипокальцемия при Д-витаминной недостаточности, которая вследствие включения системы отрицательной обратной связи приводит к повышенному синтезу паратиреоидного гормона, и гипофосфатемия могут быть ответственны за изменения ферментативных активностей в костной ткани (Wergedal, Baylink ,1971). Это предположение основывается на обнаруженных авторами данных о существовании определенной корреляции между уровнем сывороточ-

ного кальция и фосфора и активностью ферментов в костной ткани при Д-витаминной недостаточности.

Изложенные данные в сочетании с тем фактом, что многие лизосомальные ферменты обнаруживаются как в остеобластах, так и в остеокластах свидетельствуют о сложности установления роли лизосомальных ферментов в проявлении действия витамина Д на метаболизм костной ткани. Кроме того, недавно было высказано сомнение в отношении гипотезы о важной роли лизосомальных ферментов в процессе костной резорбции (Orimo a. oth., 1970).

Костная ткань является мишенью в действии витамина Д, паратиреоидного гормона и тиреокальцитонина (Алешин, 1969, 1970; Бауман, 1969; Брискин, 1971; De Luca, 1967; Norman, 1968; Aliapoulios a. oth., 1969; Aurbach a. oth., 1969; Hirsch, Munson, 1969). Взаимодействию этих биологически активных соединений принадлежит, несомненно, важная роль в регуляции метаболизма костной ткани как в нормальных условиях, так и при различных патологических состояниях, в частности при рахите. Выяснение физиологических и биохимических деталей подобного взаимодействия представляется в настоящее время довольно сложной задачей. Проблема осложняется тем, что механизм действия названных соединений в отдельности выяснен еще не полностью. Кроме того, костная ткань отличается сложным составом в метаболическом плане. В частности, минеральное содержимое скелета можно разделить на две части, одна из которых является легко обмениваемой фракцией, находящейся в физико-химическом равновесии с омывающей жидкостью, а вторая часть устанавливает с омывающей жидкостью медленно регулируемое метаболическое равновесие (Mc Lean, Urist, 1961). Витамин Д, по-видимому, воздействует главным образом на метаболизм легко обмениваемой фракции, тогда как паратиреоидный гормон взаимодействует с медленно обмениваемой фракцией костной ткани (Rasmussen, 1961). Расшифровка этой сложной системы зависит также от выяснения физико-химических и биохимических деталей структуры и функции костной ткани.

Взаимодействие между витамином Д и гормонами во многих отношениях напоминает межгормональную, а не витамино-гормональную взаимосвязь. Так, взаимодействие витамина Д, паратиреоидного гормона и тиреокальцитонина обеспечивает тонкую регуляцию всасывания, утилизации и элиминации таких важных минеральных компонентов организма, как кальций и фосфор. Это также подтверждается тем, что витамин Д и паратиреоидный гормон в некото-

рых отношениях проявляют синергическое действие. В частности, известно, что высокие дозы витамина Д применяются при лечении гипопаратиреоидизма. Следовательно, витамин Д в больших дозах в какой-то степени обладает сходным с паратиреоидным гормоном действием. Самое интересное в их взаимодействии то, что присутствие витамина Д является необходимым условием для проявления физиологического эффекта паратиреоидного гормона (Harrison a. oth., 1958; Rasmussen a. oth., 1963; Rasmussen, Feinblatt, 1971). Авторы обнаружили, что паратиреоидэктомия или введение паратиреоидного гормона не оказывает влияния на концентрацию сывороточного кальция у витамин Д-дефицитных крыс. При этом концентрация сывороточного фосфора повышалась у паратиреоидэктомированных животных, но данный эффект блокировался предварительным введением паратиреоидного гормона.

Исходя из этих данных авторы приходят к предположению, что для проявления стимулирующего эффекта паратиреоидного гормона на мобилизацию костного минерала необходимо присутствие витамина Д. Кроме того, было показано, что для проявления действия паратиреоидного гормона на мобилизацию костного минерала необходимо лишь незначительное количество витамина Д (0,3 МЕ или 0,0075 *мкг* на крысу). В связи с этим следует подчеркнуть необходимость длительного содержания экспериментальных животных на диете с высокой степенью очистки от витамина Д для создания истинной Д-витаминной недостаточности в исследованиях, направленных на выяснение роли витамина Д в действии паратиреоидного гормона.

Нечувствительность костной ткани к паратиреоидному гормону при Д-витаминной недостаточности была выявлена также в клинических исследованиях у детей (Jonxis, 1961; Steendjik, 1964) и у взрослых людей (Bernstein a. oth., 1962). Исходя из этих данных о взаимоотношении паратиреоидного гормона и витамина Д роль последнего можно расценивать как пермиссивное (разрешающее) действие в отношении проявления эффекта паратиреоидного гормона на костную ткань.

Витамин Д, по-видимому, необходим для проявления действия паратиреоидного гормона не только на костную ткань, но и на некоторые биохимические процессы. Так, было показано, что витамин Д и паратиреоидный гормон оказывают синергическое действие в отношении стимуляции высвобождения кальция из изолированных печеночных и почечных митохондрий, но при этом эффект паратиреоидного гормона проявлялся только в присутствии витамина Д

(De Luca a. oth., 1962; Sallis a. oth., 1963). Однако паратиреоидный гормон стимулировал аккумуляцию фосфатов и при отсутствии витамина Д.

Следует также отметить, что имеются данные, свидетельствующие об отсутствии указанного, пермиссивного эффекта витамина Д в отношении действия паратиреоидного гормона. По мнению Hertelendy, Taylor (1960), эффект паратиреоидного гормона на концентрацию сывороточного кальция проявляется независимо от обеспеченности витамином Д. Подобные данные были получены несколько позднее в эксперименте на мышах и крысах (Nichols a. oth., 1963; Toverud, 1964). Так как для действия паратиреоидного гормона на содержание сывороточного кальция требуется лишь незначительное количество витамина Д, предполагается возможность, что в этих исследованиях были использованы животные с неполной Д-витаминной недостаточностью, в связи с чем пермиссивное действие витамина Д не было выявлено (Rasmussen a. oth., 1963; De Luca, 1967).

Было показано, что тиреокальцитонин снижает концентрацию кальция и фосфора в сыворотке крови крыс с Д-витаминной недостаточностью, а гиперфосфатемия, вызванная паратиреоидэктомией, частично устраняется введением тиреокальцитонина как у рахитичных животных, так и у крыс, получавших витамин Д (Morii, De Luca, 1967). Тиреокальцитонин в отличие от паратиреоидного гормона, по-видимому, не нуждается в присутствии витамина Д для проявления характерного эффекта на костную ткань (Evanson a. oth., 1966; Soliman, Mac Intyre, 1966; Morii, De Luca, 1967).

При недостаточности витамина Д, как известно, нарушается всасывание кальция в кишечнике и наступает гипокальцемия. Околощитовидные железы отвечают на это нарушение гомеостаза кальция гиперплазией и повышением секреции паратиреоидного гормона, который в нормальных условиях оказывает гиперкальцемический эффект главным образом путем мобилизации кальция из костной ткани в кровь. Однако, несмотря на повышенное образование паратиреоидного гормона, последний не способен поддерживать нормальную концентрацию сывороточного кальция при рахите. Возможно, это обусловлено тем, что при Д-авитаминозе паратиреоидный гормон не способен стимулировать костную резорбцию, т. е. развитием так называемого «функционального гипопаратиреоидизма» (Bernstein a. oth., 1962). Кроме того, повышенная секреция паратиреоидного гормона при рахите приводит к повышенной потере фосфатов с мочой, поскольку этот гормон проявляет характерный

фосфат-диуретический эффект и в отсутствии витамина Д. Уменьшение всасывания кальция и вторично фосфора в кишечнике, повышенная потеря фосфатов с мочой и неспособность паратиреоидного гормона поддерживать нормальную концентрацию этих минералов в крови при авитаминозе Д приводит к снижению константы (Ca$\times$P) в крови и соответственно к нарушению минерализации костной ткани и уменьшению содержания в ней минеральных компонентов.

Хотя изложенные выше экспериментальные исследования подтверждают гипотезу о пермиссивной роли витамина Д в действии паратиреоидного гормона, по-видимому, нельзя исключить роль костных нарушений при Д-витаминной недостаточности в оценке данных относительно взаимодействия этих физиологически активных соединений. В частности, рахитичная кость плохо минерализована, а поверхность ее покрыта некальцинированным костным матриксом. В связи с этим некоторые исследователи предполагают, что витамин Д не оказывает непосредственного влияния на активность паратиреоидного гормона и контролируемые им процессы в костной ткани. Неспособность паратиреоидного гормона поддерживать нормальную концентрацию сывороточного кальция при Д-витаминной недостаточности связана с плохой минерализацией кости, вследствие чего количество кальция, освобождаемое при ее резорбции под влиянием паратиреоидного гормона, значительно меньше, чем в норме, и недостаточно для нормализации пониженного уровня сывороточного кальция (Бауман, 1968, 1969; Au, Raisz, 1967). Это подтверждается тем, что введение паратиреоидного гормона витамин Д-дефицитным крысам с гипокальцемией не приводит к повышению концентрации кальция в сыворотке крови, но этот гормон оказывает гиперкальцемический эффект в том случае, если названным крысам предварительно вводили хлорид кальция или лактозу (Au, Raisz, 1967). По мнению авторов, предварительное введение животным хлорида кальция или лактозы способствует минерализации кости и повышению содержания в ней солей кальция, вследствие чего проявляется характерный гиперкальцемический эффект паратиреоидного гормона.

Таким образом, суммируя изложенное, можно отметить, что витамин Д является, по-видимому, одним из регуляторов метаболизма костной ткани. В частности, витамин Д оказывает определенное влияние на процессы как образования, так и резорбции костной ткани. Однако механизм подобного эффекта витамина Д до сих пор не выяснен. Мы также не можем ответить на вопрос, принимает ли витамин

Д непосредственное участие в метаболизме костной ткани или его роль в регуляции названных процессов является вторичной, зависимой от действия данного витамина на уровне кишечника.

Важная роль в регуляции гомеостаза кальция и фосфора и метаболизма костной ткани принадлежит взаимодействию витамина Д, паратиреоидного гормона и тиреокальцитонина. Благодаря этому взаимодействию в нормальных условиях в организме осуществляется тонкая регуляция процессов всасывания в кишечнике, утилизации и элиминации важнейших минеральных компонентов организма в целом и костной ткани в частности — солей кальция и фосфора. Сдвигам в функциональной активности околощитовидных желез и ультимобранхиальных желез, продуцирующих соответственно паратиреоидный гормон и тиреокальцитонин, принадлежит, по-видимому, важная роль в патогенезе костных нарушений как при недостаточном, так и избыточном поступлении витамина Д.

Глава VI

ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВИТАМИНА Д

Заболевание, известное в настоящее время под названием Д-гипервитаминоза, вошло в медицинскую и ветеринарную практику в конце 20-х годов XX в. Появление его было связано исключительно с широким производством и практическим применением концентрированных препаратов витамина Д, обладающих весьма высокой биологической активностью. Первые сообщения о тяжелых отравлениях, наблюдаемых при клиническом применении препаратов облученного эргостерина, появились уже в 1928 г. С этих пор изучение механизма развития Д-гипервитаминоза и методов его терапии занимает важное место в области фармакологии витамина Д. Актуальность данного вопроса явилась причиной большого числа экспериментальных и клинических исследований, описанных как в отечественной, так и в зарубежной литературе.

Можно назвать следующие основные факторы, обусловливающие возникновение, развитие и частоту Д-витаминной интоксикации.

1. Чрезвычайно высокая биологическая активность витамина Д и относительно малая физиологическая потребность в нем.

2. Сравнительно невысокая скорость инактивации и элиминации витамина Д из организма.

3. Широкое применение концентрированных препаратов витамина Д в медицинской и сельскохозяйственной практике и недостаточная осведомленность населения о высокой токсичности данного витамина.

По-видимому, следует еще указать на недостаточно обоснованное назначение высоких доз витамина Д для профилактики и терапии рахита, что еще случается в практиче-

ской работе. В частности, известны так называемые «ударные дозы» и «уплотненные» курсы применения витамина Д по 600 000 МЕ и более, в то время как суточная физиологическая потребность детей в витамине Д составляет по данным различных авторов 200—600 МЕ, а однократный прием его в дозах 300 000—600 000 МЕ может вызвать у детей серьезные побочные явления.

Нужно отметить также, что высокие дозы витамина Д используются в качестве лечебного средства при витамин Д-резистентных рахитоподобных заболеваниях, туберкулезной волчанке, гипопаратиреозе, раке легкого и лимфогрануломатозе, врожденном вывихе бедра, остеопорозе, остеомаляции и других заболеваниях. Терапия этих патологических состояний витамином Д вследствие применения последнего в высоких дозах сопровождается во многих случаях скрытыми или выраженными признаками Д-витаминной интоксикации.

В отдельных случаях Д-витаминный токсикоз наступает при применении витамина Д в небольших дозах, близких к физиологической потребности нормального организма. Данные состояния, по-видимому, являются генетически обусловленными и характеризуются повышенной чувствительностью к витамину Д. По мнению некоторых исследователей, в основе «идиопатической гиперкальцемии» и суправальвулярного стеноза аорты лежит повышенная чувствительность к витамину Д.

Библиография по вопросам Д-гипервитаминоза довольно обширная. Кроме того, во многих случаях легкие формы токсикоза остаются нераспознанными в силу или относительно легкой переносимости или отсутствия характерных симптомов. По мнению многих специалистов, заболеваемость Д-гипервитаминозом довольно высокая, особенно в детском возрасте.

Результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о далеко идущих последствиях даже легких форм Д-гипервитаминоза. Это обусловлено значительной стабильностью морфологических изменений, возникающих при Д-витаминной интоксикации, которые выражены главным образом в виде костных нарушений и патологической кальцификации мягких тканей без видимых нарушений или с изменением их функций в той или иной форме.

Следовательно, изучение токсического действия витамина Д имеет, прежде всего, непосредственную практическую ценность. Исследование данного вопроса тесно взаимосвязано также с выяснением механизма физиологического дей-

ствия витамина Д. Кроме того, Д-гипервитаминоз является хорошей модельной системой для изучения некоторых патологических состояний. В частности, высокие дозы витамина Д используются в качестве модели для изучения механизма возникновения и развития сосудистых заболеваний, протекающих со склеротическими изменениями, почечнокаменной болезни, остеомаляции и остеопороза.

Долгое время изучение Д-гипервитаминоза носило в основном описательный характер. Это привело к тому, что в настоящее время уже известны основные клинические признаки и патоморфологические изменения при данной патологии. Однако биохимические процессы, лежащие в основе Д-гипервитаминоза далеко еще не выяснены, но стали предметом интенсивных исследований в последние годы.

Несмотря на актуальность проблемы, в настоящее время нет подробных обзоров и монографий по Д-гипервитаминозу. В связи с этим мы сочли целесообразным осветить не только теоретические стороны проблемы, но и некоторые вопросы, касающиеся клиники и диагностики Д-гипервитаминоза.

Некоторые вопросы патогенеза, клиники и диагностики Д-гипервитаминоза

Условия возникновения Д-гипервитаминоза. Граница между терапевтическими и токсическими дозами витамина Д не установлена. По мнению многих исследователей, Д-витаминная интоксикация возникает лишь при значительной передозировке витамина Д. Так, по данным А. Ф. Тур (1966), явления гипервитаминоза Д у детей развивались после приема 4 000 000 МЕ и более витамина Д. Имеется ряд рекомендаций (Тур, 1965, 1966), что курсовые дозы витамина Д (до 600 000—1 000 000 МЕ), назначаемого дробно, не вызывают гипервитаминоза. Однако в литературе описаны данные, что и меньшие дозы витамина Д способны вызвать явления интоксикации. При назначении повторного профилактического курса в 600 000 МЕ витамина Д детям в возрасте 6—8 месяцев у них наблюдалась гиперкальцемия, гиперхолестеринемия, гиперкальцийурия и снижение активности щелочной фосфатазы (Белкина, 1964). В дозе 50 *мг* (2 000 000 МЕ) и более витамин Д вызывает, по некоторым данным, тяжелую интоксикацию. Летальные исходы наблюдались при приеме 0,5—1,5 *г* (20 000 000—60 000 000 МЕ) и более витамина Д (Rüziczka, 1953). В то же время имеются данные, что при

соответствующем лечении и гораздо большие дозы витамина Д (120 000 000 МЕ) не вызывают жизненно важных сдвигов (Шевлягина, 1965).

Многие исследователи придерживаются мнения, что у экспериментальных животных гипервитаминоз Д развивается при превышении потребности организма в нем в 1 000—4 000 раз. Однако и в экспериментальных условиях не установлены четкие границы между терапевтической, токсической и летальной дозами витамина Д. Возможно, это связано с тем, что чувствительность к витамину Д зависит не только от дозы последнего, но от ряда других причин.

Одним из решающих условий в возникновении гипервитаминоза Д является отсутствие дефицита витамина Д в организме до принятия этого витамина (Хвуль, Лукьянова, 1965). В нормальном организме гипервитаминоз Д развивается быстрее, чем при наличии рахита. Однако назначение чрезмерно высоких доз витамина Д на фоне его недостаточности также может привести к интоксикации.

Различные отклонения от сбалансированного питания могут быть причиной повышенной чувствительности организма к витамину Д. Большую роль играют количество кальция и фосфора, поступающего с пищей, и соотношение Ca/P. Высокое содержание кальция в диете при назначении повышенных доз витамина Д увеличивает чувствительность ребенка к данному витамину (Белкина, 1966).

Гипервитаминоз Д развивается как при однократном, так и при длительном применении витамина Д в высоких дозах. Однако более выраженные сдвиги наступают при дробном введении препарата.

Результаты исследований, проведенных в опытах на крысах, свидетельствуют, что при беременности у этих животных снижается чувствительность организма к высоким дозам витамина Д (Ornoy, Nebel, 1970). В частности, у небеременных крыс, получавших витамин $Д_2$ в суточной дозе 40 000 МЕ в течение 11 дней, наблюдалось значительное увеличение содержания триглицеридов и свободных жирных кислот в крови и выраженные дегенеративные изменения в сердце, аорте, легких и почках. У беременных крыс, получавших витамин $Д_2$ в идентичной дозе с девятого дня беременности, патологические изменения в указанных органах были выражены слабо или они не обнаруживались.

На возникновение гипервитаминоза Д оказывает влияние и качество препарата. Частота и выраженность гипервитаминоза при применении видеина (комплекс витамина Д с казеином) значительно меньше, чем при введении равного

количества витамина $Д_2$ на спирту (Хвуль, Лукьянова, 1965). О малой токсичности видеина для детей свидетельствуют также результаты недавних исследований (Студницин, Маслов, 1970). Данные экспериментальных исследований на обезьянах показывают различный характер токсического действия витаминов $Д_2$ и $Д_3$ (Hunt a. oth., 1969). Авторы обнаружили значительное повышение концентрации кальция в сыворотке всех животных, получавших витамин $Д_3$ в суточной дозе 50 000—100 000 МЕ, и отсутствие существенных изменений в содержании кальция и фосфора в сыворотке обезьян, которым вводили витамин $Д_2$. Количество азота в моче повышалось у всех животных, получавших витамин $Д_3$, и не отличалось от нормы у обезьян, диета которых содержала витамин $Д_2$.

Чувствительность организма к высоким дозам витамина Д зависит от возраста, веса, состояния желудочно-кишечного тракта, состава пищи и некоторых других факторов (Струков, 1967). Белковое голодание, гиповитаминозы А, В и С уменьшают терапевтическую эффективность витамина Д и повышают чувствительность организма к его высоким дозам. Многочисленные клинические и экспериментальные исследования показывают, что при прочих идентичных условиях имеется различие в индивидуальной чувствительности организма к токсическим дозам витамина Д.

Клинические проявления Д-гипервитаминоза. Чрезмерно большие дозы витамина Д (несколько миллионов МЕ), принятые однократно или в течение короткого промежутка времени (несколько суток), вызывают острое отравление. Клинические проявления острого Д-гипервитаминоза развиваются через 1—8 суток после приема витамина Д (Волоховская, 1960; Шевлягина, 1965; Шевлягина и др., 1968). В картине заболевания на первое место выступают явления со стороны центральной и вегетативной нервной системы, сердечно-сосудистой системы и почек, на второй план отходят нарушения функции органов пищеварения, хотя они также проявляются достаточно рельефно (Шевлягина, 1965).

Длительное применение высоких доз витамина Д приводит к развитию хронического Д-гипервитаминоза. Характерными симптомами являются общая слабость, вялость, потеря аппетита, жажда, боли в животе, тошнота, рвота, поносы и запоры. Во многих случаях наблюдается отложение кальция в конъюнктиве (Howard, Meyer, 1948; Hass a. oth., 1958; Studer a. oth., 1962) и признаки конъюнктивита (Rüziczka, 1953). Гипервитаминоз Д проявляется общей интоксикацией организма с нарушением минерального, бел-

кового, углеводного и липидного обменов. Больные страдают упорной анорексией, теряют в весе и в тяжелых случаях доходят до резкой астении. Анорексия при Д-гипервитаминозе объясняется накоплением в крови лимонной кислоты (Лавров и др., 1963; Лавров, Терентьева, 1965), которая, по-видимому, оказывает тормозящее действие на пищевой центр в соответствии с метаболической теорией аппетита (Уголев, Кассиль, 1961).

Многие исследователи отмечают сходство картины гипервитаминоза Д у людей и у экспериментальных животных. Характерными признаками Д-гипервитаминоза у экспериментальных животных являются задержка и падение веса тела, вялость, заторможенность, апатичность, облысение, кровоизлияние вокруг глаз, отказ от еды, диспептические явления (Лавров, Терентьева, 1963; Блажеевич, 1969; Чуваев, 1969; Покровский и др., 1971; Gillman a. oth., 1960). В опытах на крысах при пятидневном введении последним витамина $Д_2$ в суточной дозе 150 000 МЕ/*кг* веса тела было обнаружено, что интенсивная потеря веса начинается с восьмого дня после первого введения витамина (Gillman a. oth., 1960). Тяжелое состояние и высокая смертность наблюдались на 11—15 день после начала введения витамина. Было показано также, что потеря веса Д-гипервитаминозных животных происходит главным образом вследствие недостаточного потребления пищи.

Как при остром, так и при хроническом гипервитаминозе Д самыми частыми и характерными симптомами являются нарушения функций почек. При несвоевременной диагностике и терапии тяжелых отравлений витамином Д чаще всего почечная недостаточность приводит к летальному исходу (Тур, 1966; Briggs, 1961; Studer a. oth., 1962). На фоне нарастающей интоксикации появляются симптомы почечной недостаточности в виде полидипсии, полиурии, изостенурии, альбуминурии, цилиндрурии, ацетонемии и азотемии. Обильное мочеиспускание и частая рвота приводят к резкой дегидратации организма. Нередко появляются симптомы, характерные для пиелонефрита: пиурия, гематурия, протеинурия и др. (Пляскова, 1967). При этом наблюдается нарушение функций клубочкового и канальцевого аппарата (особенно проксимального отдела канальцев) с понижением концентрационной способности почек и уменьшением клубочковой фильтрации. При остром отравлении витамином Д выявляется зависимость изменений почечной гемодинамики от времени, прошедшего с момента интоксикации (Шевлягина и др., 1968). В первые две недели отмечаются резкие нарушения функций

всех отделов нефрона с преобладанием поражения канальцевой функции.

Раньше всего нормализуется клубочковая фильтрация, несколько медленнее — почечный плазмоток. Характерно, что в большинстве случаев превалирует поражение канальцев. Даже при исследовании через 8 месяцев после отравления максимальная канальцевая секреция оставалась пониженной в 2 раза (Шевлягина, 1965). При наблюдении переболевших детей в течение 5—7 лет установлено, что почечные поражения часто носят хронический характер.

Нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы также характерны для Д-гипервитаминоза. Они проявляются в виде тахикардии, иногда аритмии, приглушения сердечных тонов, систолического шума, изменений ЭКГ и повышения кровяного давления (Волоховская, 1960; Пляскова, 1966, 1967; Studer a. oth., 1962; Luca, Feruglio, 1964). Иногда гипервитаминоз Д может протекать атипично, без характерных симптомов интоксикации и значительной гиперкальцемии, но с поражением сердечно-сосудистой системы и гипертонией (Пляскова, 1966). Автор наблюдала 25 детей грудного возраста с гипервитаминозом $Д_2$, у которых были обнаружены изменения со стороны сердечно-сосудистой системы. У некоторых из них заболевание протекало с нарушением кровообращения II степени.

По мнению авторов, в происхождении части так называемых идиопатических миокардитов ведущую роль играет гипервитаминоз Д. На ЭКГ детей с поражением сердца на почве гипервитаминоза Д выявляется расширение комплекса QRS до 0,06—0,08 *сек*, PQ — до 0,14—0,18 *сек*, зубец T, сглаженный во всех отведениях, двухфазный в V_4 (Пляскова, 1966; Маркович, 1969; Luca, Feruglio, 1964). По-видимому, эти нарушения являются отражением комплекса обменных и морфологических сдвигов, вызванных гипервитаминозом Д. Клинические и электрокардиографические изменения со стороны сердечно-сосудистой системы обнаруживаются не только в период интоксикации витамином Д, но и через 5—7 лет после заболевания, что может свидетельствовать о наличии серьезных морфологических поражений. Гипертония при гипервитаминозе Д, по-видимому, имеет почечное происхождение. Повышение кровяного давления наблюдается и у животных, получающих токсические дозы витамина Д (Ефимова, 1959). Экспериментальная Д-витаминная гипертония у собак и кроликов сопровождается характерными изменениями глазного дна: наблюдается нечеткость границ соска зрительного нерва, сосуды становятся извитыми, артерии — узкими. Наблюдения в течение пяти

лет показали, что у животных, перенесших Д-витаминную интоксикацию, имеет место периодическое повышение кровяного давления в течение всего периода исследования (Ефимова, 1959).

Со стороны крови при гипервитаминозе Д могут наблюдаться следующие сдвиги: гиперкальцемия, гиперфосфатемия, ацидоз, эритроцитопения, диспротеинемия, повышение остаточного азота крови, повышение содержания лимонной кислоты, гиперхолестеринемия, понижение активности щелочной фосфатазы (Волоховская, 1960; Белобородова, Кедо, 1961; Вишневский, 1967; Пляскова, 1965, 1966, 1968; Шевлягина и др., 1968; Studer a. oth., 1962). Нужно отметить, однако, что, по мнению некоторых исследователей, при Д-гипервитаминозе наблюдается и гипофосфатемия (Якубчик, Зингер, 1960; Пляскова и др., 1962; Спиричев и др., 1969), а активность щелочной фосфатазы колеблется в широких пределах (Вишневский, 1965). Анемия при гипервитаминозе Д в большинстве случаев носит гипохромный характер (Волоховская, 1960; Белобородова, Кедо, 1961; Вишневский, 1965; Пляскова, 1968). В эксперименте на крысах было показано (Спиричев и др., 1968), что токсические дозы витамина $Д_2$ оказывают подавляющее действие на эритропоэтическую функцию красного костного мозга, с чем, по-видимому, и связана эритроцитопения при гипервитаминозе Д. Кроме того, как в клинических (Пляскова, 1968), так и в экспериментальных условиях (Блажеевич, Спиричев, 1966; Спиричев, Блажеевич, 1968) токсические дозы витамина Д повышали аденозинтрифосфатазную активность и снижали стабильность эритроцитарных мембран. Гемолитическое действие токсических доз витамина Д авторы объясняют воздействием на липидный состав липопротеидной оболочки.

Уже в ранних описаниях Д-гипервитаминоза отмечаются различные нарушения со стороны нервной системы. Эти сдвиги, вызванные токсическими дозами витамина Д, отражаются на деятельности как центральной, так и периферической нервной системы. Наиболее частыми симптомами являются вялость, заторможенность, малоподвижность, сонливость, апатия, которые могут сменяться беспокойством, раздражительностью и бессоницей (Пляскова и др., 1962; Коварская, 1965; Вишневский, 1967; Briggs, 1961; Dolmierski, 1965). Периоды беспокойства у детей с Д-гипервитаминозом сочетаются с напряжением и пульсацией родничка (Пляскова и др., 1962), что дало возможность предполагать о повышении внутричерепного давления. Нарушения со стороны центральной нервной системы часто

обнаруживаются уже в начальные периоды Д-витаминной интоксикации и предшествуют соматическим симптомам (Зуева, 1965; Dolmierski, 1965). В тяжелых случаях может наблюдаться нарушение сознания с клонико-тоническими судорогами. Расстройства со стороны периферической нервной системы при гипервитаминозе Д могут быть выражены в виде парестезий, периферических невритов и полиневритов (Рассолова, 1964; Studer et al., 1962). Последствиями перенесенного Д-гипервитаминоза у детей могут быть нарушения локомоторных функций, задержка развития речи и умственного развития (Вишневский, 1967). Тяжелая Д-витаминная интоксикация, перенесенная в период беременности, может оказывать в последующем неблагоприятное влияние на умственное развитие потомства. В подобных ситуациях описаны случаи микроцефалий с проявлениями нанизма. Это связано, по-видимому, не только с обменными нарушениями в организме матери при Д-гипервитаминозе, но и с проникновением витамина Д черед плаценту от матери к ребенку. Возможность подобного транспорта витамина Д и его метаболически активной формы — 25-оксихолекальциферола через плаценту и депонирование витамина Д в плаценте уже установлены (Лукьянова, Вендт, 1965; Haddad a. oth., 1971).

У экспериментальных животных при гипервитаминозе Д также наблюдаются различные расстройства нервной деятельности, выражающиеся в виде заторможенности, каталепсии, сонливости, ослабления условно-рефлекторных реакций (Зевальд, 1958; Ефимова, 1959).

Д и а г н о с т и к а Д-г и п е р в и т а м и н о з а часто связана с большими затруднениями, поскольку внешние симптомы интоксикации бывают часто или недостаточно специфичными, или преходящими. При наблюдении 36 случаев гипервитаминоза Д у грудных детей правильный и своевременный диагноз был поставлен только в одном случае (Вишневский, 1965). Это создает необходимость учета не только клинических симптомов заболевания, но и проведение различных биохимических тестов. В таблице 34 представлены различные признаки острой и хронической Д-витаминной интоксикации у детей.

По мнению большинства исследователей, одним из наиболее характерных признаков Д-гипервитаминоза является гиперкальцемия. Определение концентрации кальция в сыворотке крови для диагностики гипервитаминоза Д важно особенно в начальный период заболевания (первые две недели), поскольку в последующем наблюдается нормализация содержания кальция в крови. Гиперкальцемия в боль-

Таблица 34

Основные признаки Д-витаминной интоксикации у детей (Пляскова, 1967)

Оцениваемый показатель	Острая интоксикация	Хроническая интоксикация
1	2	3
Доза спиртового раствора витамина $Д_2$	По 8—10 капель — 0,5 чайной ложки в течение 2 недель — 2,5 месяцев	По 2—4 капли и больше в течение 5—8 месяцев, часто в сочетании с рыбьим жиром
Степень токсикоза	II—III степени	I степень
Рвота	Частая, 2—3 раза в день, иногда бесчисленное количество раз	Нечастая, 1—2 раза в день, 2—3 раза в неделю
Аппетит	Полностью отказывается от еды, но пьет охотно	Понижен
Стул	Задержан, после клизмы может быть жидкий до 4—5 раз в сутки	Обыкновенный или запор
Вес	Потеря в весе: за 1—2 недели на 300—500 *г* и больше	Остановка в нарастании веса
Лицо	Осунувшееся, глаза обведены тенями, скучные	Бледное
Цвет кожи	Бледно-серый, часто с желтоватым оттенком	Бледный
Состояние сердечно-сосудистой системы	Тоны сердца приглушены, систолический шум у грудины в третьем и четвертом межреберьях	Расширение левой границы, непостоянный систолический шум
Печень и селезенка	Значительное увеличение печени (3,5—4 *см*), может быть увеличение селезенки (1,5—2 *см*)	Незначительное увеличение печени, но может и не быть
Кровяное давление	Гипертония, А/Д 120/180—130/80	Гипертония
Изменения в моче	Белок от следов до 0,1‰, пиурия, единичные гиалиновые и зернистые цилиндры, микрогематурия — свежие эритроциты	Белок от следов до 1,6‰, пиурия, соли, единичные свежие эритроциты, цилиндры
Са сыворотки крови	14—19,29 *мг*%	11,8—12,2 *мг*%, изредка 10 *мг* %
Р сыворотки крови	2,7—4,8 *мг*%	2,5—5,6 *мг* %
ЭКГ	Расширение комплекса QRS до 0,07—0,08, но может быть и нормальная	Расширение комплекса QRS до 0,07—0,08, низкий зубец Т в грудных отведениях
Сахарные кривые	Нарушена гликогенообразовательная функция печени, коэф. Рафальского $>$ 1	Низкий коэф. Бодуэна (15—20%)
Холестерин сыворотки крови	Возможно кратковременное повышение, максимально 298,5 *мг*%	

1	2	3
Остаточный азот	Изредка умеренное повышение до 37 *мг*%	
Сывороточный белок	Увеличение уровня белка до 7,5—8,5 *г* % за счет глобулинов	
Трансаминаза ГЩТ и ГПТ	Нормальная или незначительное увеличение, до 77,5—94 ед.	Увеличение до 113—157 ед., изредка 232 ед.
Костная ткань	Обычной плотности, изредка могут быть участки остеопороза, краниотабес, полоски склероза в ростковой зоне	Повышенной плотности, на рентгенограмме отмечается избыточное отложение извести в диафизах кости
Нервная система	Вялость, апатия, адинамия, сонливость, повышенная потливость	Возбужденность, плохой сон

шинстве случаев сопровождается гиперкальциурией. Поэтому в практической работе врачей для диагноза гипервитаминоза Д важна проба Сулькевича (Тур, 1966), как легко и быстро выполняемая процедура (Реактив Сулькевича: Ac. oxalici crystallisati—2,5, Ammonium oxalici—2,5, Ac. acetici—5 *мл.*, Aquae destillata — ad 150 *мл*). Реактив Сулькевича смешивают с двойным количеством мочи, у здоровых сразу или через несколько секунд отмечается молочноподобное помутнение; при гиперкальциурии, а следовательно, и гиперкальцемии сразу появляется грубое помутнение; при низком содержании кальция в крови и гипокальциурии смесь реактива и мочи остается совершенно прозрачной.

Снижение гемолитической стойкости и повышение аденозинтрифосфатазной активности эритроцитов при интоксикации витамином Д являются стойкими признаками и могут служить надежными тестами как для ранней, так и ретроспективной диагностики гипервитаминоза Д (Спиричев и др., 1969).

Минеральный обмен при гипервитаминозе Д

Одним из наиболее характерных проявлений Д-гипервитаминоза является нарушение минерального обмена, в особенности обмена кальция и фосфора. В частности, при гипервитаминозе Д изменяется усвоение и выделение кальция и фосфора, нарушается их гомеостаз и наблюдается патологическое перераспределение этих мине-

ралов в различных тканях организма. Эти нарушения минерального обмена ответственны за многие клинические и патологические проявления Д-гипервитаминоза. Поэтому мы сочли уместным описать в данном разделе метастатическую кальцификацию, патолого-анатомические и гистологические нарушения при Д-гипервитаминозе, хотя эти вопросы выходят за рамки минерального обмена.

Обмен кальция. В первых же исследованиях по Д-гипервитаминозу было отмечено, что характерным признаком токсического действия витамина Д является повышение концентрации кальция в крови. Гиперкальцемия является одним из наиболее ярких проявлений гипервитаминоза Д у детей (Якубчик, Зингер, 1960; Белобородова, Кедо, 1961; Пляскова и др., 1962; Вишневский, 1965; Debre, Brissand, 1949), взрослых (Певзнер, 1957; Шевлягина и др., 1968; Debre, Brissand, 1949; Kaserer a. oth., 1966) и экспериментальных животных (Gillman a. oth., 1960; Chen a. oth., 1962; Herrman, Parker, 1963; Irving a. oth., 1966; Hunt a. oth., 1969; Whittier, Freeman, 1971).

Развитие гиперкальцемии после введения высоких доз витамина Д зависит от дозы и сроков его применения, от состояния минерального обмена до введения витамина Д и ряда других причин. Большинство исследований свидетельствуют, что гиперкальцемия более выражена при дробном применении витамина Д. Так, при введении одинаковой дозы витамина Д одномоментным или дробным методом только в последнем случае наступала значительная гиперкальцемия и гиперкальциурия. Однако имеются данные, что выраженная гиперкальцемия развивается и после однократного применения витамина Д (Kaloud, Stendte, 1953). В большинстве случаев с увеличением дозы витамина Д повышается гиперкальцемический эффект и становятся более выраженными другие симптомы гипервитаминоза Д. Также имеются данные, что не существует прямой зависимости между дозой витамина Д, степенью гиперкальцемии и тяжестью состояния (Вишневский, 1965). При введении высоких доз витамина Д на фоне гипокальцемии, обусловленной или недостатком витамина Д, или недостаточностью паращитовидных желез, гиперкальцемия бывает мало выраженной, или же не развивается. Степень гиперкальцемии при Д-витаминной интоксикации зависит также от диетических факторов: с повышением содержания кальция в диете гиперкальцемия становится более выраженной. В зависимости от названных условий концентрация кальция в сыворотке крови при гипервитаминозе Д колеблется в различных пределах: от 11—16 *мг%* (Белобородова, Кедо, 1961; Пляско-

ва и др., 1962; Debre, Brissand, 1949) до 20—24 *мг*% (Вишневский, 1965; Раскин, 1968; Шевлягина и др., 1968; Illig, Prader, 1959).

В эксперименте на крысах (Gillman a. oth., 1960), которым в течение 5 дней вводили витамин Д в суточной дозе 15 000 МЕ/100 *г* веса тела было показано, что концентрация кальция в сыворотке крови практически не отличается от нормального уровня через 24 *час* после первого введения витамина Д, но значительно повышается к третьему дню и достигает максимума к седьмому дню эксперимента. В следующие дни концентрация сывороточного кальция быстро снижалась, в результате чего уже через 5 дней после прекращения введения витамина Д наблюдалась лишь незначительная гиперкальцемия, а через 15 дней после отмены препарата содержание кальция в крови нормализовалось и не менялось в течение всех последующих 140 дней эксперимента. Аналогичные сдвиги наблюдаются при пятидневном введении витамина Д крысам в дозе 7500 МЕ/100 *г* веса тела (Irving a. oth., 1966). Несколько иные результаты были получены в клинических исследованиях (Шевлягина и др., 1968). Авторы в течение года наблюдали 24 больных гипервитаминозом Д (средний возраст 35 лет), которые употребили спиртовый раствор витамина $Д_2$ в общей дозе от 4 000 000 до 120 000 000 МЕ в 2—3 приема в течение 7 дней. При этом максимальная гиперкальцемия (17—18 *мг*% в среднем) наблюдалась через 20—24 дня после приема витамина Д. Через 5—6 недель гиперкальцемия была незначительной (11,2 *мг*%), после чего наблюдалась постепенная нормализация содержания кальция в сыворотке крови. Таким образом, гиперкальцемия более выражена в ранние сроки гипервитаминоза Д. Возможно, в связи с этим во многих клинических исследованиях отмечается, что гиперкальцемия обнаруживается далеко не во всех случаях Д-гипервитаминоза, особенно если после приема токсической дозы витамина Д прошло довольно длительное время. Об этом могут свидетельствовать данные, что даже в случаях выраженной гиперкальцемии (15—24 *мг*%) содержание кальция в сыворотке крови нормализуется в течение нескольких недель после приема токсических доз витамина Д (Раскин, 1968). Следовательно, гиперкальцемия не является стойким признаком Д-гипервитаминоза, сохраняющимся в течение длительного периода времени. Концентрация кальция в сыворотке крови в поздних стадиях гипервитаминоза Д остается во многих случаях на нормальном уровне, несмотря на наличие тяжелых морфологических и функциональных изменений в ря-

де органов, в частности в сердечно-сосудистой системе и почках.

Рассмотрим возможные механизмы, обусловливающие характерную динамику концентрации сывороточного кальция при гипервитаминозе Д. Одним из решающих факторов в развитии гиперкальцемии при введении высоких доз витамина Д является, по-видимому, чрезвычайное усиление всасывания кальция в кишечнике. Подобное мнение согласуется с тем фактом, что одной из основных функций витамина Д является стимуляция абсорбции кальция в кишечнике. Кроме того, имеются экспериментальные и клинические подтверждения названного предположения. В частности, было показано (Clark, Smith, 1964), что у крыс с гипервитаминозом Д в течение 24 *час* экскретируется с калом только 3,3% перорально введенного Ca^{45}, в то время как у нормальных животных экскреция кальция с калом за одинаковый промежуток времени составляет около 30% введенного количества Ca^{45}. Эти данные указывают на значительное усиление всасывания кальция в кишечнике при гипервитаминозе Д. Повышенное всасывание кальция в кишечнике отмечалось и у детей с идиопатической гиперкальцемией (Fellers, 1959). Аналогичные данные об усилении транспорта кальция в кишечнике при Д-витаминной интоксикации были получены и в других исследованиях (Бауман, 1969; Nicolaysen, 1937).

Высокие дозы витамина Д могут вызвать гиперкальцемию у животных, содержащихся на диете, бедной или даже лишенной кальция (Hess a. oth., 1931). Следовательно, можно полагать, что повышению концентрации сывороточного кальция при гипервитаминозе Д способствует усиление всасывания в кишечнике не только экзогенного, но и эндогенного кальция. На возможность данного предположения указывают результаты балансового исследования, проведенного на цыплятах, содержавшихся на низкокальциевой диете (Бауман, 1969). При этом автором было обнаружено, что витамин Д-дефицитные цыплята выделяли с пометом кальция почти в 2 раза больше, чем получали его с кормом, в то время как у цыплят, получавших витамин Д, баланс кальция был положительным. Следовательно, витамин Д способствует абсорбции не только пищевого кальция, но и эндогенного кальция, экскретируемого в желудочно-кишечный тракт.

Результаты многочисленных клинических и экспериментальных исследований (Якубчик, Зингер, 1960; Пляскова и др., 1962; Коварская, 1965; Carlsson, 1952; Harris, 1956; Briggs, 1961; Studer a. oth., 1962) свидетельствуют о повы-

шении мобилизации минеральных веществ из предобразованной костной ткани при гипервитаминозе Д. Усиленная резорбция костного минерала под действием высоких доз витамина Д является, по-видимому, одним из факторов, обусловливающих гиперкальцемию при Д-витаминной интоксикации. В связи с этим интересно отметить, что при гипервитаминозе Д отмечается параллелизм между уменьшением содержания кальция в костях и повышением его концентрации в сыворотке .

Таким образом, усиленное поступление кальция в кровь из кишечника (путем стимуляции абсорбции экзогенного и эндогенного кальция) и костной ткани (путем усиления резорбции костного минерала) при гипервитаминозе Д направлено на повышение концентрации сывороточного кальция. Как известно, концентрация кальция в крови является одним из важнейших физиологических показателей организма и поддерживается на постоянном уровне благодаря взаимодействию ряда биологически активных соединений (витамин Д, паратиреоидный гормон, тиреокальцитонин). Поэтому естественно ожидать, что изменение концентрации сывороточного кальция вызывает соответствующую реакцию организма, направленную на нормализацию данного показателя.

Многие клинические и экспериментальные работы показывают, что при гипервитаминозе Д наряду с усилением всасывания кальция в кишечнике, повышенной мобилизацией костного минерала и гиперкальцемией значительно возрастает экскреция кальция с мочой (Белкина, 1965; Пляскова, 1968; Honet, 1946; Dent a. oth., 1954; Schönholzer, 1958; Illig, Prader, 1959). Величина экскреции кальция с мочой при гипервитаминозе Д достигает значительных пределов по сравнению с нормальным уровнем. Так, в эксперименте на крысах (Clark, Smith, 1964) было показано, что длительное введение витамина Д в суточных дозах 100 000 или 600 000 МЕ/*кг* веса тела в течение 15—30 дней вызывает 10—15-кратное повышение суточной экскреции кальция по сравнению с контрольными животными. Гиперкальциурия характерна также и для гипервитаминоза Д у людей (Белкина, 1965; Пляскова, 1968; Schönholzer, 1958; Illig, Prader, 1959).

Увеличение экскреции кальция с мочой при гипервитаминозе Д, по-видимому, связано с уменьшением его канальцевой реабсорбции (Dent a. oth., 1954). Механизм подобного действия высоких доз витамина Д выяснен еще не полностью. Можно, однако, полагать, что данный эффект является результатом нарушения функции почек или снижения функциональной активности паращитовидных желез. Как

известно (Kleeman a. oth., 1958; Buchanan, 1961), паратиреоидный гормон повышает реабсорбцию кальция в почечных канальцах, а при гипервитаминозе Д, сопровождающемся гиперкальцемией, наблюдается снижение синтеза данного гормона.

Повышенную экскрецию кальция с мочой при гипервитаминозе Д можно рассматривать как компенсаторный процесс, направленный на выведение избытка кальция и нормализацию повышенного уровня сывороточного кальция. Возможно, этот компенсаторный механизм может противодействовать повышению концентрации кальция в крови при применении относительно невысоких доз витамина Д или при однократном введении его в высоких дозах. Однако данный механизм оказывается недостаточным при длительном воздействии токсических доз витамина Д, когда, несмотря на 10—15-кратное увеличение экскреции кальция с мочой, задержка последнего в организме остается увеличенной в значительной степени (Clark, Smith, 1964).

Способность почек усиливать экскрецию кальция в случаях тяжелого Д-гипервитаминоза может оказаться сниженной вследствие повреждающего действия высоких доз витамина Д на почечную ткань (Раскин, 1968). Результатом этого может быть нормальное или даже сниженное выделение кальция почками при выраженных признаках Д-гипервитаминоза. По мнению автора, в появлении интенсивной гиперкальцемии при тяжелой интоксикации витамином Д существенная роль может принадлежать недостаточному выделению кальция почками вследствие нарушения функции последних.

Гипервитаминоз Д сопровождается уменьшением веса паращитовидных желез и снижением их функциональной активности (Бауман, 1969; Rasmussen a. oth., 1963). Данный эффект можно объяснить с позиции гипотезы (Mc Lean, 1957) о существовании системы отрицательной обратной связи между уровнем кальция в сыворотке крови и функциональной активностью паращитовидных желез. Следовательно, сниженное образование паратиреоидного гормона (гиперкальцемический фактор) при гипервитаминозе Д можно также рассматривать как защитную реакцию организма, направленную на снижение гиперкальцемического эффекта высоких доз витамина Д. Однако вследствие того, что влияние витамина Д на всасывание кальция в кишечнике и резорбцию костного минерала не зависит от присутствия или отсутствия паратиреоидного гормона, снижение продукции последнего не способно привести к полной нормали-

зации содержания кальция в сыворотке крови при применении чрезмерно высоких доз витамина Д.

Важная роль в системе регуляции обмена кальция в организме принадлежит тиреокальцитонину — гормону, продуцируемому в «С-клетках» парафолликулярного аппарата щитовидной железы или в ультимобранхиальных тельцах. Данный гормон, как известно (Алешин, 1969, 1970; Брискин, 1971; Aliapoulios a. oth., 1969; Aurbach a. oth., 1969; Copp, 1969a, b; Hirsch, Munson, 1969), оказывает тормозящее влияние на резорбцию кости и тем самым проявляет гипокальцемическое действие. В связи с этим естественно предполагать, что гипокальцемическое действие тиреокальцитонина играет важную роль в защитной реакции организма при введении высоких доз витамина Д. Это предположение подтверждается тем, что у крыс, лишенных щитовидной железы (т. е. при условии устранения действия эндогенного тиреокальцитонина), резко усиливается токсическое действие больших доз витамина Д (Bugnon a. oth., 1967). Напротив, применение тиреокальцитонина снижает токсический эффект высоких доз витамина Д (Milhaud, 1968; Melancon, De Luca, 1969). Многочисленные исследования показывают, что при гиперкальцемических состояниях (в том числе и при гиперкальцемии, вызванной введением высоких доз витамина Д) наблюдается повышенная секреция тиреокальцитонина. Последнее подтверждается результатами исследований, в которых показано истощение кальцитонин-содержащих гранул при гиперкальцемических состояниях. Подобные данные, в частности, получены в эксперименте на крысах (Bugnon a. oth., 1967; Ericson, 1968; Gittes a. oth., 1968; Rohr, Hasler, 1968; Frankel, Vasumura, 1971) мышах (Nanba, Fujita, 1969), цыплятах (Melander a. oth., 1971), поросятах (Care a. oth., 1968), коровах (Capen, Young, 1969) и в клинических исследованиях (Milhaud, 1968).

Представляет интерес выяснение вопроса, происходит ли стимуляция синтеза тиреокальцитонина при гиперкальцемии или наблюдается лишь повышенная секреция гормона из депо? В этом отношении еще нет единого мнения. Однако результаты недавних экспериментальных исследований (Frankel, Vasumura, 1971) свидетельствуют о возможном повышении скорости синтеза тиреокальцитонина при длительной гиперкальцемии, вызванной хроническим введением высоких доз витамина Д. Эта точка зрения основывается на том, что однократное и двукратное введение крысам высоких доз витамина $Д_3$ вызвало снижение содержания тиреокальцитонина в щитовидной железе, в то время как более длительное применение витамина приводило к по-

вышению концентрации гормона и увеличению веса щитовидной железы.

При введении тиреокальцитонина детям с гиперкальцемией, связанной с повышенной чувствительностью к витамину Д или Д-витаминной интоксикацией, наблюдается снижение содержания кальция в крови (Milhaud, 1968). Исходя из этих данных можно предполагать, что повышение скорости секреции и, возможно, эндогенного синтеза тиреокальцитонина при гипервитаминозе Д направлено в сторону нормализации повышенного уровня концентрации сывороточного кальция. Это подтверждается тем, что скорость секреции тиреокальцитонина находится в прямой зависимости от уровня кальция в сыворотке крови (Care a. oth., 1968) и контролируется, по-видимому, функционированием высокоэффективного регуляторного механизма по типу отрицательной обратной связи (Copp, 1969). При этом секреция тиреокальцитонина возрастает не со снижением (как в случае с паратиреоидным гормоном), а с повышением концентрации сывороточного кальция.

Гипокальцемический эффект тиреокальцитонина при гипервитаминозе Д объясняется, по-видимому, ингибирующим действием гормона на процессы резорбции костной ткани. Это подтверждается тем, что гипокальцемическое действие тиреокальцитонина выявляется у нефрэктомированных (Hirsch, Munson, 1969), паратиреоидэктомированных и эвисцерированных (Aliapoulios, Munson, 1965) животных, а основным органом-мишенью для этого гормона является костная ткань. Вероятно, тиреокальцитонин оказывает не только непосредственное тормозящее влияние на резорбцию кости (Gaillard, 1967; Foster, 1968), но также ингибирует стимулирующий эффект высоких доз витамина Д на мобилизацию костного минерала. На последнюю возможность указывает то, что действие тиреокальцитонина выражено сильнее в тех случаях, когда гиперкальцемия вызывается большими дозами витамина Д или паратиреоидным гормоном, которые усиливают резорбцию костей, а не введением солей кальция (Hirsch, Munson, 1969).

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют, что повышенная секреция тиреокальцитонина не способна полностью блокировать гиперкальцемический эффект высоких доз витамина Д, в связи с чем гипервитаминоз Д сопровождается повышением концентрации данного минерала по сравнению с содержанием его в сыворотке у нелеченных больных (Milhaud, 1968). Несостоятельность тиреокальцитонинсинтезирующей системы полностью ингибировать гиперкальцемический эффект токсических доз витамина Д,

по-видимому, может быть отражением следующих факторов (Frankel, Vasumura, 1971): 1) ограниченная скорость синтеза и секреции тиреокальцитонина; 2) быстрое истощение депо тиреокальцитонина; 3) ограниченная способность тиреокальцитонина в ингибировании процессов резорбции костной ткани; 4) неспособность тиреокальцитонина ингибировать стимулирующий эффект витамина Д на всасывание кальция в кишечнике.

В настоящее время накоплен целый ряд фактов, свидетельствующих, что токсические дозы витамина Д оказывают стимулирующее действие на систему гипофиз — кора надпочечников, что выражается в гипертрофии последних и увеличении образования кортикостерона (Чуваев, 1969, 1971). Экспериментальный гипервитаминоз Д сопровождается стимуляцией синтеза кортикостероидов тканью надпочечников также в условиях in vitro (Balestreri a. oth., 1963). Кроме того, при гиперфункции надпочечников или дополнительном введении глюкокортикоидов наблюдается понижение уровня кальция в крови у экспериментальных животных (Бауман, 1969; Kimberg, 1969).

Исходя из этих данных можно было бы полагать, что повышение глюкокортикоидной активности надпочечников представляет собой специфический ответ организма на повышение концентрации сывороточного кальция. Однако исследования показывают, что повышение веса надпочечников и их функциональной активности может наблюдаться не только при гипервитаминозе Д, но и при Д-витаминной недостаточности (Бауман, 1969; Kimberg, 1969). Кроме того, имеются данные (Гусеинова, 1968), свидетельствующие, что кортикостероиды могут оказывать синергическое с витамином Д действие на минеральный обмен. По-видимому, увеличение веса надпочечников под влиянием как дефицита, так и избытка витамина Д может свидетельствовать, что эта реакция организма не является специфичным ответом на обеспеченность витамином Д. В связи с этим представляет интерес, что реакция надпочечников при гипервитаминозе Д проявляется в двух выраженных стадиях — активации в начальный период и некоторого угнетения в последующие сроки (Бауман, 1969). Подобная стадийность в действии системы гипофиз — надпочечники весьма характерна для стресса (Селье, 1960).

Таким образом, высокие дозы витамина Д путем чрезмерного повышения всасывания кальция в кишечнике и мобилизации данного минерала из предобразованной костной ткани вызывают гиперкальцемию. Уровень кальция в крови, как известно, является одним из важнейших физио-

логических показателей организма, поэтому при отклонении его содержания от нормы включаются все механизмы, принимающие участие в регуляции его обмена. Возможно, этим в некоторой степени объясняется тот факт, что гиперкальцемия не является постоянным признаком Д-гипервитаминоза. Исходя из изложенного, гиперкальцемию при гипервитаминозе Д можно рассматривать как результат влияния высоких доз витамина Д и других регуляторов кальциевого обмена.

Обмен неорганического фосфата. Метастатическая кальцификация мягких тканей при гипервитаминозе Д сопровождается осаждением кальция в тканях в виде фосфорных солей. Результаты клинических и экспериментальных исследований свидетельствуют, что применение высоких доз витамина Д приводит к значительным сдвигам и в обмене неорганического фосфата. Кроме того, как известно, обмен кальция и фосфора в организме тесно взаимосвязан. Так, в норме произведение (Ca$\times$P) в сыворотке является величиной постоянной, а при многих патологических состояниях повышение концентрации кальция сопровождается понижением концентрации фосфора и наоборот (следует отметить, что при некоторых заболеваниях концентрация обоих ионов в сыворотке крови может быть и повышена и понижена). Следовательно, изучение метаболизма фосфора при гипервитаминозе Д также заслуживает большого внимания.

Изменения в обмене фосфора при гипервитаминозе Д, по-видимому, могут быть обусловлены рядом факторов и имеют довольно сложную природу. Так, литературные данные об изменениях в фосфорном обмене при Д-витаминной интоксикации противоречивы. В частности, имеются сведения, что у детей (Sharma, Anand, 1965), взрослых людей (Levy a. oth., 1949) и экспериментальных животных (крысы, мыши, собаки, кролики, коровы, обезьяны, цыплята) (Follis, 1956; Grant a. oth., 1961; Eisenstein a. oth., 1962; Capen a. oth., 1965; Capen, Young, 1969) при повторном применении высоких доз витамина Д наблюдается повышение содержания неорганического фосфора в сыворотке крови. При этом концентрация сывороточного фосфора возрастала у людей до 9 *мг%*, а у экспериментальных животных — до 8—12 *мг%*. Однако имеются и совершенно противоположные данные, свидетельствующие, что как клинический, так и экспериментальный гипервитаминоз Д сопровождается понижением концентрации фосфора в сыворотке крови (Плясковa и др., 1962; Вишневский, 1965; Плясковa, 1967; Chen, Bosman, 1964; Friedman, Roberts, 1966). Авторы наблюдали

снижение концентрации сывороточного фосфора до 2,5—3,5 *мг%*. Наконец, имеются сообщения, что при гипервитаминозе Д не наблюдается заметных изменений в концентрации сывороточного фосфора (Illig, Prader, 1959).

Таким образом, исследования показывают, что при гипервитаминозе Д изменения в обмене фосфора могут иметь различную направленность. По-видимому, это является результатом того, что при применении высоких доз витамина Д на фосфорный обмен в организме оказывают влияние многие факторы и в зависимости от выраженности последних может наблюдаться различный эффект. В частности, при гипервитаминозе Д могут функционировать механизмы, ведущие как к повышению, так и к снижению содержания фосфора в крови. Рассмотрим названные механизмы.

Повышение концентрации сывороточного фосфора при гипервитаминозе Д может наблюдаться под влиянием следующих факторов.

1. Высокие дозы витамина Д, стимулируя абсорбцию кальция в кишечнике, могут одновременно усиливать всасывание неорганического фосфора и приводить к гиперфосфатемии.

2. Витамин Д, примененный в больших дозах, способствует мобилизации костного минерала (в том числе и фосфора) и тем самым может приводить к повышению концентрации фосфора в сыворотке крови. Так, при гипервитаминозе Д повышение концентрации сывороточного фосфора и кальция происходит одновременно с уменьшением содержания кальция в костной ткани (Freeman, Chang, 1950), что может указывать на связь между гиперфосфатемией и резорбцией костного минерала.

3. Гиперфосфатемия при Д-витаминной интоксикации может быть результатом усиления реабсорбции неорганического фосфата в почечных канальцах вследствие снижения функции паращитовидных желез (отметим, что паратиреоидный гормон увеличивает экскрецию фосфатов с мочой и вызывает гипофосфатемию), обусловленного развитием гиперкальцемии и, соответственно, включением системы отрицательной обратной связи между уровнем кальция в сыворотке крови и функциональной активностью паращитовидных желез.

4. Повышение концентрации сывороточного фосфора при гипервитаминозе Д может быть обусловлено непосредственным стимулирующим влиянием витамина Д на реабсорбцию фосфатов в почечных канальцах. Об этом свидетельствуют результаты исследований на нормальных, паратиреоидэктомированных и рахитичных крысах при по-

мощи микропункции проксимальных отделов извитых канальцев почек (Gekle a. oth., 1969, 1971), в которых было показано, что витамин Д оказывает прямое, не зависящее от функции паращитовидных желез, стимулирующее действие на реабсорбцию фосфатов в канальцах.

При гипервитаминозе Д кроме названных факторов, ведущих к развитию гиперфосфатемии, могут возникать условия, приводящие к снижению концентрации сывороточного фосфора. В частности, усиленная кальцификация мягких тканей при Д-витаминной интоксикации, сопровождающаяся осаждением в тканях фосфорных солей кальция, по-видимому, может обусловливать снижение концентрации фосфора в крови. Другой возможной причиной гипофосфатемии при гипервитаминозе Д является поражение функций проксимальных отделов почечных канальцев, подвергающихся усиленной кальцификации при Д-витаминной интоксикации, следствием чего может быть нарушение реабсорбции неорганического фосфата и увеличение потери его с мочой (Пляскова, 1967).

Для критической оценки изменений фосфорного обмена при гипервитаминозе Д, очевидно, следует учитывать и такие факторы, как содержание кальция и фосфора в диете, дозу и длительность введения витамина Д, степень поражения и нарушения функций органов, в особенности всасывательной функции слизистой кишечника, реабсорбционной и выделительной функции почек. В частности, известно, что всасывание неорганического фосфора в кишечнике зависит не только от абсолютного содержания солей кальция и фосфора в диете, но и от отношения кальций/фосфор. Кроме того, гиперфосфатемия более характерна для ранней стадии гипервитаминоза Д (Levy a. oth., 1949). По-видимому, на ранних стадиях Д-витаминной интоксикации преобладают факторы, ведущие к гиперфосфатемии: усиление всасывания фосфатов в кишечнике, стимуляция мобилизации костного минерала, повышенная реабсорбция фосфатов в почечных канальцах. В последующем в связи с усилением отложения солей кальция и фосфора в мягких тканях, нарушением реабсорбции фосфата в почках вследствие повреждения почечных канальцев может наблюдаться гипофосфатемия.

Нарушения обмена кальция и фосфора при гипервитаминозе Д не ограничиваются рассмотренными выше явлениями деминерализации предобразованной костной ткани, изменения экскреции с мочой и содержания этих минералов в крови. Одним из основных проявлений гипервитаминоза Д является метастатическая кальцификация мяг-

ких тканей и связанные с ними морфологические изменения, приводящие к нарушению функции органов.

Метастатическая кальцификация при гипервитаминозе Д носит генерализованный характер и охватывает почти все органы и ткани. В частности, интенсивной кальцификации подвергаются почки, сердечно-сосудистая система, слизистая желудочно-кишечного тракта, гладкая мускулатура, соединительная ткань, связки, хрящи (Певзнер, 1957, 1966; Лавров, Терентьева, 1963; Bauer, Freyberg, 1946; Chaplin a. oth., 1951; Gillman a. oth. 1960; Briggs, 1961; De Wind, 1961; Eisenstein, Zernolis, 1964; Scarpelli, 1965; Kaserer a. oth., 1966; Roszkiewicz a. oth., 1970; Zawistowski a. oth., 1970a, b). Эти данные были получены на многих видах экспериментальных животных и в клинических исследованиях.

У экспериментальных животных метастатическая кальцификация развивается обычно при введении витамина Д в суточной дозе 5000—20 000 МЕ/100 *г* веса тела в течение 5—20 дней. В этих условиях патологическое отложение солей кальция в мягких тканях обнаруживается уже на третий-пятый день эксперимента (Briggs, 1961; Irving a. oth., 1966). При применении более низких доз витамина Д метастатическая кальцификация, по-видимому, не развивается. Применение более высоких доз витамина Д, очевидно, несколько ускоряет развитие и увеличивает степень патологической кальцификации. Так, при введении витамина Д крысам в суточной дозе 40 000—200 000 МЕ уже через 2 дня были обнаружены очаги обызвествления в мягких тканях (Хвуль и др., 1961). Однако вопрос о зависимости степени кальцификации мягких тканей от дозы витамина Д исследован еще не достаточно.

Степень развития метастатической кальцификации оказывается более выраженной при длительном введении витамина Д, чем при более кратковременном применении идентичной суммарной дозы (Hass a. oth., 1958). Отметим при этом, что подобное взаимоотношение наблюдается при развитии гиперкальцемии и многих других симптомов Д-витаминной интоксикации. При длительном введении высоких доз витамина Д патологическая кальцификация мягких тканей может достигать исключительно высокой степени. Так, при выраженных случаях Д-гипервитаминоза на вскрытиях животных и людей участки отложения кальция в мягких тканях обнаруживаются визуально.

Сердечно-сосудистая система при гипервитаминозе Д подвергается особенно интенсивной кальцификации (за исключением венозных сосудов, где в большинстве

случаев не обнаруживаются участки обызвествления). В частности, метастатической кальцификации при Д-гипервитаминозе подвергаются эндокард, миокард, клапаны сердца, коронарные сосуды, аорта, берцовая и бедренная артерии, сосуды гладких мышц, пищеварительного тракта и скелетных мышц (Алексеенко, 1964; Hass a. oth., 1958, 1966; Eisenstein, Zernolis, 1964; Kobylinski, 1969a, b, 1971; Ebel a. oth., 1971). Повышенное накопление кальция в сердце и крупных сосудах обычно обнаруживается уже на третий-пятый день после начала введения высоких доз витамина Д. В дальнейшем содержание кальция в этих тканях быстро возрастает, достигая очень высоких величин. Так, содержание данного минерала в аорте при выраженном Д-гипервитаминозе может достигать 13—14% (отметим при этом, что содержание кальция в бедренной кости равняется приблизительно 22%) (Gillman a. oth., 1960). Аорта и крупные сосуды напоминают при этом трахею (Герценберг, 1929) или каменные трубы (Kreitmair, Moll, 1928).

Степень кальцификации различных структур сердца при гипервитаминозе Д неодинакова и, как правило, уменьшается в следующем порядке: внутренняя эластичная мембрана коронарных артерий — гладкие мышцы коронарных артерий — фиброэластическая ткань эндокарда — миокард (Hass a. oth., 1958).

В миокарде наблюдается дегенерация и некроз мышечных волокон с последующей их кальцификацией. В тяжелых случаях гипервитаминоза Д кальцификация может охватить до трети миокарда и приводить к нарушению сердечной деятельности (Певзнер, 1957а; Hass a. oth., 1958; Kobylinski, 1969).

Клапаны сердца подвергаются мукоидному перерождению с субэндокардиальным накоплением мукополисахаридов и последующим развитием фиброза и кальциноза (Beuren a. oth., 1966; Kaserer a. oth., 1966; Kobylinski, 1969). Кальцификация сердечных клапанов может приводить к развитию пороков сердца и сердечной недостаточности.

Во внутренней эластичной мембране и мышечной оболочке коронарных сосудов появляются дегенеративные изменения, ксантоматозные и липидные отложения, которые в последующем подвергаются кальцификации (Hass a. oth., 1958, 1966; Kobylinski, 1969). В тяжелых случаях гипервитаминоза Д наблюдается обызвествление всех коронарных сосудов, что приводит к нарушению питания сердечной мышцы.

Повреждения в стенке аорты и крупных артериальных сосудов при гипервитаминозе Д локализуются преимущест-

венно в средней оболочке. Наиболее рано кальцификации подвергаются эластичные волокна, а затем — волокна коллагена. При прогрессировании процесса кальцификация распространяется на все клеточные элементы, межклеточное пространство и захватывает всю толщу стенки сосудов (Hass a. oth., 1958, 1966; Eisenstein, Zernolis, 1964; Kobylinski, 1969). Кальцификации аорты, как правило, предшествуют дегенеративные изменения и некроз стенки сосуда с разрушением эластичной ткани, отложением мукополисахаридов и прогрессирующим снижением активности митохондриальных ферментов (сукцинат- и глутаматдегидрогеназ, моноаминооксидазы, аденозинтрифосфатазы) (Kobylinski 1969; Ebel a. oth., 1971). Названные изменения, по-видимому, имеют определенную роль в механизме кальцификации.

Участки некроза подвергаются в последующем репаративным процессам с коллагенизацией средней и наружной оболочек, что приводит к возникновению рубца и стенозу сосудов. Эти изменения обнаруживаются как в экспериментальных (Gillman a. oth., 1960; Friedman, Roberts, 1966), так и клинических (Beuren a. oth., 1966; Peterson a. oth., 1965) исследованиях с гипервитаминозом Д.

В результате названных изменений стенки сосудов становятся толстыми и ригидными, а внутренняя поверхность аорты и крупных артерий выглядит неровной. Иногда встречаются местные расширения по типу аневризм или сужение просвета сосудов из-за разрастания внутренней оболочки. Участки пролиферации клеток средней оболочки, названные «интимальной подушкой» (Eisenstein, Zernolis, 1964), и расположенные под ними очаги кальцификации образуют в стенке аорты бляшки (Gillman. a. oth., 1960; Hass a. oth., 1966; Friedman, 1968). Эти бляшки при гипервитаминозе Д имеют сходство с повреждениями аорты при экспериментальном и клиническом атеросклерозе.

Описанные изменения сосудистой стенки (стенозы и аневризмы) при тяжелых случаях гипервитаминоза Д могут приводить к развитию сердечной недостаточности. Введение высоких доз витамина Д во время беременности может приводить к тяжелым изменениям в сосудистой системе плода. В частности, у крольчат, родившихся от самок, получивших во время беременности 1 500 000 МЕ витамина Д, обнаружено 14 различных форм повреждений аорты (Friedman, Roberts, 1966). У части из них поражения аорты были сходны с надклапанным стенозом аорты у человека, у других изменения выражались в генерализованной дегенерации и кальцификации средней оболочки. Эти сдвиги, по-видимо-

му, обусловлены тем, что витамин Д, как указывалось выше, проникает через плаценту от матери к плоду. Нужно отметить, однако, что в недавних исследованиях, проведенных на крысах (Roszkiewicz a. oth., 1970; Zawistowski a. oth., 1970a), были получены иные результаты. Обнаружено, что применение высоких доз витамина $Д_3$ беременным крысам не вызывает у потомства явлений метастатической кальцификации, хотя у матерей появлялись все признаки гипервитаминоза Д, в том числе и патологическое отложение солей кальция в мягких тканях.

Почки являются одним из органов, которые часто поражаются при гипервитаминозе Д. Кальцификация данного органа обнаруживается уже на второй-третий день от начала введения высоких доз витамина Д и в течение короткого промежутка времени достигает значительной степени (Engfeldt a. oth., 1962; Scarpelli, 1965). Так, у крыс, получавших ежедневно по 50 000 МЕ витамина $Д_2$, содержание кальция в почке на четвертый день опыта повышалось до 80—300 *мг*/100 *г* обезжиренной ткани (нормальное содержание 30—50 *мг*). На седьмой день опыта содержание кальция в почечной ткани достигало 1 400—3 120 *мг*/100 *г*, превышая, таким образом, нормальный уровень в 30—60 раз. Несколько меньшее количество кальция было обнаружено в почечной ткани у кроликов при гипервитаминозе $Д_2$ (Певзнер, 1957б). Автор установил, что содержание кальция в почках кроликов, получавших в течение 100 дней по 500 000 МЕ витамина $Д_2$ в сутки, достигало 900 *мг*%.

Наиболее ранними изменениями в почечной ткани, появляющимися в первые же дни после введения высоких доз витамина Д, являются нарушение структуры и функции митохондрий эпителиальных клеток и дегенерация эпителия проксимальных канальцев (Певзнер, 1957; Hass a. oth., 1958; Engfeldt a. oth., 1962; Scarpelli, 1965). В последующем в пораженных митохондриях откладываются соли кальция, и кальцифицированные митохондрии образуют конгломераты. Постепенно минерализации подвергается вся клетка. Кальцинированный эпителий слущивается, отторгается, образуя солевые цилиндры и камни, которые могут закупоривать просвет канальцев и вызывать их расширение. Изменения почек при гипервитаминозе Д могут постепенно захватить весь нефрон, что приводит в конечном счете к нефрокальцинозу и нарушению функции почек.

Печень при гипервитаминозе Д, по-видимому, не подвергается выраженной кальцификации (Hass a. oth., 1958). Однако Д-витаминная интоксикация сопровождается увеличением веса, полнокровием и дистрофическими изменения-

ми печени, дискомплексацией печеночных клеток и появлением небольших воспалительных инфильтратов. Причина отсутствия кальциноза печени (в отличие от многих других органов) при гипервитаминозе Д не выявлена.

Легочная ткань при гипервитаминозе Д также подвергается кальцификации. Степень кальцификации легочной ткани менее выражена по сравнению с аортой или почками. Так, у крыс после 4-дневного введения витамина $Д_2$ в суточной дозе 100 000 МЕ/*кг* веса тела содержание кальция в легочной ткани было повышено в 6—8, а в аорте — в 30 раз (Grant a. oth., 1961). Кальцификация легочной ткани уменьшает эластичность последней и может явиться причиной развития эмфиземы легких и легочной недостаточности.

В желудочно-кишечном тракте при гипервитаминозе Д могут обнаруживаться очаги обызвествления (Engfeldt a. oth., 1962; Scarpelli, 1965). Повышение содержания кальция в стенке желудка и кишечника наблюдается уже на третий-пятый день введения высоких доз витамина Д. Степень кальцификации этих органов сравнима с обызвествлением легочной ткани.

В плаценте при экспериментальном гипервитаминозе Д были выявлены изменения дегенеративного характера, проявляющиеся в отложении мукополисахаридов, мукопротеидов и извести в лабиринте, в основных мембранах эмбриональных кровеносных сосудов, а также в цитоплазме трофобластических клеток (Roszkiewicz a. oth., 1970). Эти сдвиги могут приводить к различным нарушениям в росте и развитии плода при гипервитаминозе Д.

Таким образом, гипервитаминоз Д сопровождается метастатической кальцификацией многих органов. Во многих случаях эти изменения протекают с нарушением функции органа. Метастатические отложения солей кальция являются довольно стойкими и сохраняются в течение длительного промежутка времени. В связи с этим изучение механизмов развития метастатической кальцификации при гипервитаминозе Д представляет интерес как в теоретическом, так и практическом плане.

Известно, что содержание кальция во многих тканях почти соответствует его концентрации в плазме. В связи с этим естественно предполагать, что гиперкальцемия при гипервитаминозе Д приводит к увеличению концентрации кальция в межклеточной и внутриклеточной жидкостях и пересыщению их данным катионом с последующим выпадением солей кальция в осадок. Данное предположение подтверждается тем, что при гиперкальцемии, вызванной

дополнительным введением глюконата кальция или увеличением отношения кальций/фосфор в рационе, также наблюдается развитие нефрокальциноза, как и в случае с гипервитаминозом Д. Однако развитие метастатической кальцификации может наблюдаться и при отсутствии заметного повышения концентрации кальция в сыворотке крови. Так, при длительном введении высоких доз витамина $Д_2$ кроликам с интервалами между каждым введением в 2—4 недели наблюдается генерализованная кальцификация мягких тканей, не сопровождающаяся гиперкальцемией (Eisenstein a. oth., 1962). Следовательно, можно ожидать, что возникновение гиперкальцемии при гипервитаминозе Д не является единственным условием для развития метастатической кальцификации. По-видимому, существуют и другие механизмы, обусловливающие патологическое отложение солей кальция в мягких тканях при Д-витаминной интоксикации.

Известно, что связывание кальция в растворимые комплексы с белками и органическими кислотами, в частности с цитратом, и действие специфических ингибиторов кальцификации способствуют сохранению кальция в растворенном состоянии и препятствуют его осаждению. В частности, 30—40% кальция крови (нефильтруемая фракция) обратимо связано с сывороточными белками, а 60—70% способно к ультрафильтрации через целлофановую мембрану при pH 7,4 и температуре 37° (Toribara a. oth., 1957). Около 75% ультрафильтруемого кальция представлено в сыворотке крови в виде двухвалентных ионов, 25% — в форме растворимых комплексов, главным образом с цитратом, фосфатом и бикарбонатом (Neuman, Neuman, 1958).

Следовательно, кальций в крови присутствует в двух формах — ионизированной и неионизированной. Первая физиологически активна, тогда как вторая, напротив, неактивна и представляет собой кальций, связанный с различными компонентами сыворотки. Изменение соотношения этих двух форм, по-видимому, может приводить к определенным сдвигам в осаждаемости кальция. В связи с этим можно было бы предполагать, что в развитии метастатической кальцификации при Д-витаминной интоксикации существенная роль может принадлежать снижению способности плазмы и тканевой жидкости удерживать кальций в растворенном состоянии.

Однако исследования показывают, что концентрация лимонной кислоты в сыворотке крови при гипервитаминозе Д или не изменяется (Eisenstein a. oth., 1962), или увеличивается в значительной степени (Лавров, Терентьева, 1963,

1965), что должно способствовать растворимости кальция. Не обнаружены также изменения отношения между общим и ультрафильтрующимся кальцием плазмы. Доля кальция, прочно связанного с сывороточными белками, при гипервитаминозе Д не только не уменьшается, а, наоборот, возрастает (Арешкина и др., 1957), что должно бы способствовать повышению стойкости кальция в растворе.

Таким образом, при изучении факторов, определяющих устойчивость кальция в плазме крови при гипервитаминозе Д, не удалось выявить каких-либо заметных изменений, снижающих эту устойчивость. Повышенное содержание лимонной кислоты и доли сывороточного белка, образующие растворимый комплекс с кальцием, при гипервитаминозе Д обусловлено, по-видимому, защитной реакцией организма в ответ на повышение уровня кальция в сыворотке крови.

Можно предположить, что в механизме метастатической кальцификации при гипервитаминозе Д определенную роль могут играть предшествующие структурные и биохимические изменения в тканях, подвергающихся кальцификации. Так, при гипервитаминозе Д наблюдается повышенное окисление тканевых липидов, ведущее к нарушению структурной целостности и функциональной активности липопротеиновых мембран клеток и клеточных органелл, в частности к снижению гемолитической стойкости эритроцитов, подавлению аденозинтрифосфатазной активности тканей, набуханию митохондрий и разобщению окислительного фосфорилирования, нарушению активного переноса кальция в митохондриях (Спиричев и др., 1965, 1968, 1969; Шипицына, 1965, 1966, 1967а, б; Блажеевич, Спиричев, 1966а; Спиричев, 1967, 1971; Спиричев, Блажеевич, 1968б; Спиричев, Милосердова, 1968; Блажеевич, 1969; Смирнов, Щипицына, 1969; De Luca a. oth., 1960, 1962; Scarpelli, 1965; Cambria, Billitteri, 1970; Billitteri a. oth., 1971). Многие из названных структурных и биохимических сдвигов, вызванных применением высоких доз витамина Д, выявляются в большинстве случаев до обнаружения участков патологической кальцификации.

По мнению Scarpelli (1965), значительная роль в механизме метастатической кальцификации при гипервитаминозе Д может принадлежать нарушению процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях и снижению способности последних к активному транспорту кальция. Это предположение в некоторой степени подтверждается тем, что при введении экспериментальным животным с Д-гипервитаминозом 2,4-динитрофенола, вещества, являюще-

гося разобщителем окислительного фосфорилирования, усиливается степень метастатической кальцификации. Предполагается, что разобщение окислительного фосфорилирования и нарушение активного накопления кальция митохондриями при гипервитаминозе Д может быть обусловлено токсическим действием перекисных соединений, образующихся непосредственно из витамина Д или из эндогенных ненасыщенных липидов, окисление которых индуцируется названным витамином (Щипицына, 1967; Смирнов, Щипицына, 1969; Спиричев, 1971; Scarpelli, 1965). Этот предположительный механизм развития метастатической кальцификации при гипервитаминозе Д представляет несомненный интерес и заслуживает дальнейшего исследования.

Согласно современным представлениям, в процессах развития как нормальной, так и патологической кальцификации значительная роль принадлежит, по-видимому, полимерным макромолекулам (полисахариды, структурированные белки, особенно коллаген), функциональные группы которых представляют собой центры, облегчающие образование первичных кристаллов солей кальция и переход растворенного ионизированного кальция из жидкой фазы в твердую (Ньюман У., Ньюман М., 1961; Glimcher, 1959). В связи с этим представляет интерес выяснить, происходит ли метастатическое отложение кальция при гипервитаминозе Д путем самопроизвольного выпадения кальция в осадок, или данный процесс идет на каких-то органических матрицах.

На экспериментальных животных было показано, что при гипервитаминозе Д отложение солей кальция в мягких тканях (почки, сердце, аорта, коронарные артерии, гладкая мускулатура желудка) сопровождается параллельным накоплением мукополисахаридов, обнаруживаемых с помощью специфических реакций и путем прямого химического определения входящих в их состав гексозы и гексозамина (Eisenstein, Groff, 1957; Gillman a. oth., 1960). При этом наблюдалась полная идентичность в локализации отложения солей кальция и накопления мукополисахаридов. Исходя из этих данных, авторы приходят к предположению, что мукополисахарид, обладая повышенным сродством к Ca, может представлять собой органическую матрицу, на которой происходит отложение солей кальция в мягких тканях при гипервитаминозе Д. Это согласуется с представлением, что мукополисахариды принимают непосредственное участие в процессах кальцификации (Касавина и др., 1970). В частности, предполагается, что комплексы коллагена и мукополисахаридов служат центрами для образования ядер

кристаллизации, на которых затем происходит рост минералов (Ньюман У., Ньюман М., 1961).

Одновременно с накоплением мукополисахаридов в мягких тканях было обнаружено повышенное содержание их и в сыворотке крови при гипервитаминозе Д (Eisenstein, Groff, 1957). В связи с этим авторы предполагают, что обусловленное высокими дозами витамина Д рассасывание костной ткани с выходом в кровоток минерального компонента и органической матрицы представляет собой источник повышенного накопления мукополисахаридов в мягких тканях, подвергающихся в последующем кальцификации.

Дальнейшим подтверждением предположения об участии мукополисахаридов в развитии метастатической кальцификации мягких тканей при гипервитаминозе Д явились результаты опытов по включению меченых предшественников в мукополисахариды. Так, было показано, что при гипервитаминозе Д наблюдается повышенное включение меченого неорганического сульфата в мукополисахариды разных органов и тканей (Konetzki a. oth., 1962; Junge-Hülsing a. oth., 1969; Rave a. oth., 1970). При этом величина стимуляции включения радиометки в полисахариды достигала значительных пределов. В сердце и аорте гипервитаминозных животных включение сульфата S^{35} в сульфомукополисахариды увеличивалось на 180%, а в почках — на 240% по сравнению с контрольной группой (Junge-Hülsing a. oth., 1969) (отметим, что кальцификация названных органов при гипервитаминозе Д выражена во многих случаях в наибольшей степени). Исходя из результатов этих исследований можно предполагать, что повышенное накопление мукополисахаридов в различных органах при гипервитаминозе Д обусловлено не только усиленным рассасыванием костного материала, но и стимуляцией синтеза мукополисахаридов непосредственно в мягких тканях. Механизм усиления обмена мукополисахаридов в мягких тканях при гипервитаминозе Д остается неясным.

Для выяснения участия мукополисахаридов в метастатической кальцификации при гипервитаминозе Д важно выявить временную связь между накоплением мукополисахаридов и появлением очагов патологической кальцификации. Результаты ранних исследований в этом направлении (Konetzki a. oth., 1962) показали, что, по-видимому, накопление мукополисахаридов скорее следует за первой стадией кальцификации мягких тканей при гипервитаминозе Д, чем предшествует ей. Однако в более поздних исследованиях с применением меченого сульфата натрия и Ca^{45} (Junge-Hülsing a. oth., 1969; Rave a. oth., 1970) было показано, что

применение высоких доз витамина Д вызывает первичное усиление обмена мукополисахаридов с последующим вторичным патологическим обызвествлением мягких тканей.

Введение высоких доз витамина $Д_3$ беременным крысам не вызвало у потомства явлений патологической минерализации, хотя у матерей появлялись все признаки гипервитаминоза Д, в том числе гетеротопическое отложение извести в мягких тканях (Roszkiewicz a. oth., 1970; Zawistowski a. oth., 1970a, b). В организме матери, в том числе и в плаценте, при этом наблюдалось значительное понижение активности щелочной фосфатазы, аденозинтрифосфатазы, дегидрогеназ, а также повышение активности кислой фосфатазы и накопление мукополисахаридов, т. е. изменение обмена веществ, связанных с процессом кальцификации, в то время как у плода названные сдвиги не отмечались. Отсутствие гетеротопической кальцификации у плода авторы объясняют ретенцией в плаценте субстанций, фиксирующих кальций, в то время как в организме матери мукополисахариды могут входить в состав матрицы, необходимой для возникновения патологических отложений извести во многих органах и тканях.

Обмен другого возможного компонента матрицы (коллагена) для отложения солей кальция при гипервитаминозе Д изучен недостаточно. По-видимому, содержание коллагена в тканях, подвергающихся метастатической кальцификации, существенно не меняется (Gillman a. oth., 1960). В связи с этим предполагается, что если коллаген необходим для развития метастатической кальцификации, то отложение солей кальция в этих условиях происходит, по-видимому, не на вновь образованных, а на преобразованных, химически модифицированных коллагеновых матрицах. Возможное значение изменений некоторых физико-химических свойств тканевых белков в образовании матриц для осаждения солей кальция в процессе развития метастатической кальцификации предполагают и другие исследователи (Schönholzer, 1958; Scarpelli, 1965).

Таким образом, повышение концентрации кальция и фосфора в сыворотке крови при гипервитаминозе Д не является единственной причиной развития метастатической кальцификации. Существенная роль в этом процессе, по-видимому, принадлежит структурным и биохимическим изменениям в тканях, возникающим под влиянием высоких доз витамина Д, и образованию соответствующей органической матрицы, способствующей гетеротопическому отложению солей кальция.

Углеводный обмен при гипервитаминозе Д

Токсические дозы витамина Д ведут к нарушению обменных процессов в цикле Кребса, что вызывает повышение содержания лимонной кислоты в крови и мягких тканях. Очень сильное повышение содержания цитратов в организме может лежать в основе нарушения обменных процессов при Д-витаминном токсикозе (Лавров, Терентьева, 1965).

Имеются два подхода к объяснению обусловленной витамином Д высокой концентрации цитратов: витамин Д может стимулировать синтез или тормозить распад молекулы лимонной кислоты (Norman, 1968). Так, ряд исследователей (Ramalingaswami a. oth., 1954; Dikshit a. oth., 1956; Joshi a. oth., 1957; Meyer a. oth., 1959) в эксперименте на животных показали, что относительно большие дозы витамина Д значительно повышают активность фермента цитрогеназы, главным образом в костных хрящах, осуществляющего конденсацию ацетилированного коэнзима А со щавелевоуксусной кислотой с образованием лимонной кислоты. Исходя из этих данных, авторы предполагают, что витамин Д стимулирует биосинтез лимонной кислоты, в связи с чем при введении высоких доз данного витамина наблюдается повышенное образование и накопление цитратов.

Однако не все исследователи придерживаются подобной точки зрения. В опытах на срезах хрящевой и костной ткани с применением C^{14}-ацетата было найдено (Norman, De Luca, 1964b; Kunin, Krane, 1965b), что введение крысам витамина Д приводит к повышению количества радиоактивного цитрата, снижению концентрации радиоактивности в других органических кислотах цикла трикарбоновых кислот и уменьшению количества радиоактивной углекислоты. В связи с этим авторы приходят к заключению, что витамин Д, по-видимому, не повышает синтез лимонной кислоты в хрящевой и костной ткани, а уменьшает скорость его превращения в дальнейшие промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот. Кроме того, введение витамина Д крысам снижает окисление лимонной и изолимонной кислот в гомогенатах почек (De Luca a. oth., 1957a) и в изолированных митохондриях почек (De Luca a. oth., 1957b). Подобный эффект наблюдается и в условиях in vitro при добавлении витамина Д в препараты изолированных митохондрий почек рахитичных крыс (De Luca, Steenbock, 1957). В связи с этим авторы предполагают, что накопление цитратов в крови и тканях при гипервитаминозе Д происходит в резуль-

тате ингибирования окисления лимонной кислоты. Механизм подобного действия витамина Д, по-видимому, обусловлен подавлением активности ферментов, катализирующих превращение лимонной кислоты в дальнейшие промежуточные продукты цикла Кребса. В частности, имеются данные, что при гипервитаминозе Д в митохондриях почек наблюдается снижение активности фермента изоцитратдегидрогеназы (Scarpelli a. oth., 1960), катализирующего окисление изоцитрата. Кроме того, известно, что аконитаза, превращающая цитрат в аконитат и изоцитрат, требует соучастия сульфгидрильных групп в качестве кофактора, а применение токсических доз витамина Д вызывает заметную потерю этих групп, по-видимому, вследствие их окисления соединениями типа перекисей липидов, образование которых индуцируется при гипервитаминозе Д (Спиричев, 1971). Следующим возможным механизмом ингибирования витамином Д окисления лимонной кислоты может быть торможение физического проникновения лимонной кислоты в митохондрии вследствие изменения структуры и функциональной активности липопротеиновых мембран при гипервитаминозе Д (De Luca, 1967).

Известно, что более 80% всей лимонной кислоты, содержащейся в организме, обнаруживается не в мягких тканях, а в костной ткани (Dickens, 1940, 1941). Ее концентрация в сухих обезжиренных костях составляет около 1%. Следовательно, можно ожидать, что повышение концентрации лимонной кислоты в сыворотке крови при гипервитаминозе Д в какой-то степени обусловлено стимуляцией рассасывания костной ткани и выходом ее компонентов, в том числе цитратов, в кровяное русло.

Таким образом, при Д-витаминной интоксикации наблюдается накопление лимонной кислоты в сыворотке крови и во многих органах и тканях. Механизм развития и роль данного явления выяснены еще не полностью. Однако, исходя из данных об образовании прочного комплекса при взаимодействии лимонной кислоты с ионами кальция, в котором они теряют свою физиологическую активность, можно предполагать, что организм защищается от излишков ионов кальция при гипервитаминозе Д путем накопления цитрата. Известно, что количество лимонной кислоты в костях и крови определяется не только присутствием витамина Д, но и зависит от обеспеченности животных солями кальция и фосфора (Guroff a. oth., 1963). Авторы полагают, что для повышения концентрации лимонной кислоты в крови и костной ткани важен не столько сам витамин Д, сколько вызываемый им кальцемический эффект.

Механизм токсического действия витамина Д

В настоящее время уже не вызывает сомнения факт, что нарушение обмена кальция не является единственной причиной различных патологических сдвигов, обнаруживаемых при гипервитаминозе Д. Выяснилось, что развитию метастатической кальцификации при Д-витаминной интоксикации могут предшествовать многочисленные структурные и биохимические изменения в клетках и клеточных органеллах различных тканей. Эти сдвиги, по современным представлениям, могут играть определяющую роль в механизме токсического действия витамина Д.

Одним из значительных сдвигов при гипервитаминозе Д, обусловливающих ряд патологических изменений, является нарушение структуры и функциональной активности митохондрий, выражающееся в их набухании, разобщении окислительного фосфорилирования и снижении способности к активному транспорту кальция. Так, набухание митохондрий различных органов и изменение их структуры в виде появления митохондрий неправильных размеров и форм, содержащих дезорганизованные кристы и вакуоли, и, наконец, разрушение митохондрий с последующим их аггрегированием наблюдались рядом исследователей у разных видов животных с гипервитаминозом Д (Scarpelli, 1960; 1965; Engfeldt a. oth., 1962; Bertolotti, De Pra, 1963; Capen a. oth., 1965; Capen, Young, 1969). Подобные же результаты получены и в условиях in vitro при добавлении витамина Д к изолированным препаратам митохондрий. Показано также, что добавление витамина Д к лизосомам печени вызывает их разрушение (de Duve a. oth., 1962). Эти данные в сочетании с тем, что витамин Д накапливается в липопротеиновых мембранах клеток и субклеточных структур (Norman, De Luca, 1964), а присутствие его в физиологических количествах необходимо для поддержания нормальной структуры митохондрий (De Luca a. oth., 1960), дают основание полагать о разрушающем действии токсических доз витамина Д на структуру и функциональную активность липопротеиновых мембран.

Введение витамина Д в токсических дозах одновременно с названными структурными изменениями значительно тормозит окисление и особенно фосфорилирование в митохондриях сердца и почек и, таким образом, вызывает разобщение процесса окислительного фосфорилирования (Щипицына, 1965, 1966, 1967а, б; Scarpelli, 1960, 1965). При анализе функций изолированных митохондрий наблюдается

значительное угнетение потребления кислорода в сердце и почках при полном торможении фосфорилирования в обеих тканях (Щипицына, 1966). Некоторое усиление поглощения кислорода при одновременном снижении утилизации неорганического фосфата наблюдается в цельных гомогенатах сердца и почек Д-гипервитаминозных животных. Однако в обоих случаях наблюдается выраженное разобщение процесса окислительного фосфорилирования.

Митохондрии, как известно, являются основными поставщиками энергии, необходимой для нормального протекания многочисленных энергозависимых биохимических процессов в живой клетке. Поэтому естественно ожидать, что вызываемое высокими дозами витамина Д повреждение митохондрий и их энергообразующего аппарата может играть важную роль в развитии патологических нарушений при гипервитаминозе Д. В частности, известно, что реабсорбция ионов кальция почечным эпителием является активным процессом и требует доставки метаболической энергии. В соответствии с названными процессами митохондрии при гипервитаминозе Д оказываются не в состоянии осуществить свою функцию по связыванию и транспорту ионов кальция, в результате тормозится транспорт ионов кальция, а эпителиальные клетки оказываются перегруженными этим минералом, что способствует патологическому осаждению солей кальция и развитию нефрокальциноза (Scarpelli, 1965). В пользу этих представлений свидетельствует тот факт, что при введении динитрофенола (метаболический ингибитор, подавляющий или разобщающий процесс окислительного фосфорилирования) наблюдается торможение реабсорбции ионов кальция (Chen, Neuman, 1955) и быстрое увеличение концентрации кальция в тканях (Гроздов, 1968), а одновременное скармливание крысам высоких доз витамина Д и динитрофенола значительно усиливает метастатическую кальцификацию (Scarpelli, 1965).

Гипервитаминоз Д сопровождается рядом нарушений липидного обмена, а именно гиперхолестеринемией и повышенным накоплением липидов в некоторых тканях, способствующих развитию холестеринового атеросклероза и липоидоза аорты (Бавина, 1952; Арешкина и др., 1957; Певзнер, 1957а; Белобородова, Кедо, 1961; Пляскова и др., 1962; Вишневский, 1970; Langen, Donath, 1956; Scarpelli, 1965; Constantinides, 1963). Предполагается, что названные сдвиги в липидном обмене при гипервитаминозе Д обусловлены нарушением структуры и ферментативной активности митохондрий (Scarpelli a. oth., 1960). Важную роль при этом играет снижение активности липолитических ферментов.

Механизм повреждающего действия токсических доз витамина Д на структуру и функциональную активность митохондрий выяснен еще не полностью. Возможно, существенную роль в этом процессе играет повышение тканевой концентрации кальция (Scarpelli, 1965), поскольку известно, что ионы кальция оказывают повреждающее действие на митохондрии, выражающиеся в их набухании и разобщении окислительного фосфорилирования (Скулачев, 1962). Однако еще не выявлено, предшествует ли повышение тканевой концентрации кальция митохондриальным нарушениям. Другой возможный механизм развития названных сдвигов может быть связан с прямым повреждающим действием высоких доз витамина Д на структуру и функциональную активность митохондрий (Спиричев, 1971; Capen a. oth., 1965). Это подтверждается тем, что добавление витамина Д к изолированным препаратам митохондрий в условиях in vitro вызывает в них изменения, подобные тем, которые определяются у животных с гипервитаминозом Д (Спиричев, Милосердова, 1968; De Luca a. oth., 1962).

О повреждающем действии токсических доз витамина Д на структуру и функцию липопротеиновых мембран клеток и клеточных органелл свидетельствуют также результаты исследований по определению активности некоторых ферментов, связанных с мембранами субклеточных структур. Так, было выявлено, что при экспериментальном гипервитаминозе Д у крыс гистологически выявляется увеличение активности эстераз и катепсина в эпителиальных клетках проксимальных извитых канальцев (Scarpelli a. oth., 1960). Это, по-видимому, является результатом повреждающего действия токсических доз витамина Д на лизосомальные мембраны, поскольку имеются данные, что добавление витамина Д к суспензии лизосом в условиях in vitro оказывает сильное лабилизирующее действие на лизосомальные мембраны, ускоряя их распад и выход лизосомальных ферментов в раствор (De Duve a. oth., 1963). Кроме того, было показано, что витамин $Д_2$ в условиях in vitro ингибирует общую активность мембраносвязанного фермента лизосом — β-глюкозидазы и приводит к значительному выходу «растворимого» фермента лизосом — β-галактозидазы, в надосадочную жидкость (Покровский и др., 1971). В связи с этим можно предполагать, что изменение проницаемости или повреждение мембраны лизосом и освобождение содержащихся в них гидролитических ферментов, расщепляющих основные ингредиенты живой клетки, может играть важную роль в развитии тканевых повреждений при гипервитаминозе Д.

Обнаружены также значительные сдвиги в активности митохондриальных ферментов при гипервитаминозе Д. Применение высоких доз витамина Д приводит к снижению активности изоцитратдегидрогеназы, никотинамидадениндинуклеотид-диафоразы (НАД-диафораза) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-диафоразы (НАДФ-диафораза) в почках, по-видимому, вследствие нарушения структуры митохондрий и выхода митохондриальных белков в цитоплазму (Scarpelli a. oth., 1960). В почках крыс с явлениями $Д_2$-гипервитаминоза наблюдается снижение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и цитохромоксидазы (ЦО) — ферментов, прочно связанных с внутренней митохондриальной мембраной (соответственно на 20 и 21% по сравнению с контролем), в то время как активность ферментов митохондриального матрикса — малатдегидрогеназы (МДГ) и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы изменялась лишь в незначительной степени (Покровский и др., 1971). Можно предполагать, что прямое повреждающее действие витамина Д на митохондриальные мембраны играет важную роль в развитии названных сдвигов. Это подтверждается результатами опытов in vitro, где витамин $Д_2$, как и в случае с лизосомальными ферментами, снижал активность мембраносвязанных митохондриальных ферментов — сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы и приводил к значительному выходу «растворимых» митохондриальных ферментов — малатдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы в надосадочную жидкость (Покровский и др., 1971).

Дальнейшим подтверждением предположения о важной роли мембранных нарушений в механизме токсического действия витамина Д явились результаты опытов, в которых было найдено, что высокие дозы витамина $Д_2$ как в условиях in vivo, так и в условиях in vitro вызывают гемолиз эритроцитов с последующим выходом из них гемоглобина и ингибирование Ca- и Mg-стимулируемых аденозинтрифосфатазных активностей оболочки эритроцитов, аорты, тонкого кишечника, легких и мозга (Блажеевич и др., 1965; Спиричев и др., 1965; Блажеевич, 1967, 1969; Блажеевич, Спиричев, 1966б; Драгнева и др., 1966; Спиричев, Блажеевич, 1968а). Аденозинтрифосфатазная активность, будучи связана с процессами активного транспорта ионов и метаболитов через биологические мембраны, может отражать целостность и функциональную активность последних. Следовательно, ингибирование этой активности, по-видимому, вследствие взаимодействия с функциональными группами фермента, может также свидетельствовать о повреждающем действии

токсических доз витамина Д на липопротеиновые мембраны (Спиричев, Блажеевич, 1968б).

Присутствие витамина $Д_2$ в условиях in vitro приводило к быстрому окислению оксигемоглобина и цитохрома С (Блажеевич, Спиричев, 1966а). Кроме того, синтетические антиоксиданты, подавляющие образование перекисных соединений, предохраняли эритроциты от оксидативного и гемолитического действия витамина $Д_2$ (Спиричев, Блажеевич, 1968а) и снимали его ингибирующий эффект на аденозинтрифосфатазную активность «теней» эритроцитов (Спиричев, Блажеевич, 1968б). Эти данные в сочетании с невозможностью объяснить окисляющее действие витамина $Д_2$ химическими свойствами молекулы этого витамина привели к предположению об образовании из него соединений перекисной природы, ответственных за его окисляющее действие (Блажеевич, Спиричев, 1966а). Экспериментальная оценка данного предположения показала, что витамин $Д_2$ в водной среде в условиях, близких к физиологическим (pH 7,0; 37°), подвергается быстрому аутоокислению с образованием перекисных и карбонильных соединений свободнорадикального характера (Спиричев и др., 1971).

Распад перекисных соединений, образованных из витамина Д, по-видимому, инициирует по свободнорадикальному механизму процессы пероксидации ненасыщенных липидов и окисление других важнейших компонентов липопротеиновых мембран (Блажеевич, 1969; Спиричев, 1971). Подтверждением этому служат результаты экспериментов, в которых было обнаружено, что инкубация эритроцитов с витамином $Д_2$ сопровождается накоплением продуктов перекисного окисления липидов (Спиричев, Блажеевич, 1968а), а введение токсических доз витамина $Д_2$ экспериментальным животным приводит к усилению пероксидации липидов в различных тканях (Блажеевич, 1969). Кроме того, витамин Д ускоряет окисление ненасыщенных липидов в простейших модельных системах: водных дисперсиях ненасыщенных жирных кислот, их эфиров, фосфолипидов яичного желтка (Спиричев, Зиновьева, 1968; Журикова и др., 1971; Helbig, 1968). Во всех этих экспериментах применение антиоксидантов, особенно α-токоферола, ингибировало стимулирующее влияние витамина Д на пероксидацию ненасыщенных жирных кислот, что указывает на окислительный характер названных реакций.

Таким образом, витамин Д индуцирует окисление ненасыщенных жирных кислот с образованием перекисных соединений. Последние, как известно, являются высокореакционноспособными токсичными соединениями, ответствен-

ными за возникновение ряда патологических нарушений. В частности, перекиси липидов способны вызвать повреждение клеточных и субклеточных мембран, окисление тиоловых соединений и сульфгидрильных групп белковых молекул с денатурацией последних, инактивацию ряда ферментов, разобщение окислительного фосфорилирования, окисление цитохрома С, торможение клеточного деления, преждевременное старение и даже гибель некоторых организмов (Воскресенский, Левицкий, 1970; Владимиров, Арчаков, 1972). В связи с этим предполагается, что индуцируемое витамином Д образование перекисных соединений имеет существенное значение в возникновении структурных и биохимических нарушений при гипервитаминозе Д. Описанным выше процессам принадлежит важная роль в механизме токсического действия витамина Д (Спиричев, 1971). Дальнейшее развитие этих представлений, несомненно, приведет к созданию стройной концепции о механизмах не только токсического, но и физиологического действия витамина Д.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, нами сделана попытка проанализировать механизм действия витамина Д. Хотя в настоящее время накоплено достаточно материала о влиянии витамина Д в целом организме на функции некоторых органов и систем, изучение его влияния на молекулярные процессы практически только началось. Это диктует новый подход к оценке специфики действия данного стероида. Анализ молекулярных механизмов действия витамина Д и сопоставление его влияния с другими стероидными соединениями привело нас к заключению, что нет принципиальной разницы в их характере действия. В том и другом случаях речь идет о химических агентах, регулирующих внутриклеточные процессы посредством действия на мембранные структуры клеток и активность генетического материала. Поэтому мы считаем целесообразным сопоставить витамин Д и другие стероиды по химической структуре и по механизму действия, что поможет понять сущность регуляции клеточного гомеостаза стероидами.

Прежде всего следует подчеркнуть, что, как и стероидные гормоны, витамин Д имеет собственные клетки-мишени, как, например, клетки слизистой кишечника и костной ткани. Эти различия объясняются нами спецификой химического строения определенных групп гормонов стероидной структуры и витамина Д. Хотя органы-мишени для стероидов отличаются по своей структуре и функции, они имеют специфические рецепторные молекулы в цитоплазме и ядрах клеток, которые концентрируют и транспортируют их в клетке. В данном случае, как это ни странно, витамин Д напоминает тестостерон, который связывается в очень ма-

лой степени или совсем не связывается с рецепторами, а рецептор взаимодействует с его активным метаболитом (или метаболитами). Для витаминов группы Д таковыми являются 25-оксиформы и 1,25-диоксиформы. Следовательно, витамин Д, как таковой, представляет собой как бы предшественника активных форм, взаимодействующих с внутриклеточными рецепторами и вызывающими специфический физиологический ответ клетки. Метаболическая трансформация, приводящая к активации молекулы витамина Д, происходит в две стадии — в печени и почках, после чего активные метаболиты витамина Д транспортируются в клетки органов-мишеней и связываются с рецепторными молекулами. Отличительной особенностью рецептора является то, что он строго дифференцирует различные стероиды по химической структуре. В частности, стероидные гормоны и холестерин не взаимодействуют с рецепторами для витаминов Д в клетках органов-мишеней и не влияют на связывание активных метаболитов витамина Д рецепторами. Из этого можно сделать заключение, что рецепторное поле белковых молекул, выполняющих функцию рецепторов, комплементарно только активным метаболитам витамина Д, а не стероидам вообще. Если принять во внимание, что активные метаболиты отличаются наличием лишь одной полярной группировки — ОН для 25-оксиформы и двух полярных группировок — ОН для 1,25-диоксиформы, то напрашивается вывод, что в фиксации витаминов Д важное значение принадлежит полярным связям посредством — ОН-групп. Отсутствие этих групп у витамина Д в 17β-боковой цепи или в 17β-боковой цепи и в кольце А при C_1 ослабляет или лишает его возможности взаимодействовать с рецептором. Таким образом, оптимальными «партнерами» в связывании витаминов Д являются соединения, имеющие 2 или 3 полярные группировки ОН. Для последних в молекуле активных метаболитов витаминов Д необходимо определенное расположение, так как по этому признаку удается отличить преимущественное влияние на слизистую тонкого кишечника или на костную ткань. Метаболиты, влияющие на клетки слизистой кишечника, имеют ОН-группы в положениях C_1, C_3 и C_{25}, а также C_3, C_{25} и C_{26} или в положениях C_3 и C_{25}. На клетки костной ткани преимущественно действуют соединения с ОН-группами в положениях C_3 и C_{25}; C_3, C_{21} и C_{25} или C_1, C_3 и C_{25}. Из них взаимодействует с клетками слизистой кишечника метаболит с ОН-группами в положениях C_3, C_{25} и C_{26}, а с клетками костной ткани — с ОН-группами в положениях C_3, C_{21} и C_{25}. По другим структурным при-

знакам витамины Д не отличаются от своих активных метаболитов.

Интересной особенностью распределения витамина Д в клетке является преимущественное накопление его активных метаболитов в ядрах. Причем распределение активных метаболитов витамина Д зависит от исходного фона и от величины его концентрации в крови. Так, при введении животным физиологических доз витамина Д на фоне его недостаточности наблюдается преимущественное накопление витамина прежде всего в органах-мишенях, в основном в ядрах, хотя он обнаружен и в цитоплазме и митохондриях. Эта селективность утрачивается при введении более высоких доз витамина. В этих условиях не удается выявить различий в тканевом и субклеточном распределении витаминов Д. Эта закономерность присуща всем биологически активным стероидам, регулирующим внутриклеточные процессы.

Основной функцией витаминов Д является регуляция транспорта Ca^{2+} и вторично фосфатов в клетках слизистой кишечника и костной ткани. Останавливаясь на молекулярных механизмах этого транспорта, следует отметить, что кальций проникает в клетки посредством переносчиков против градиента концентрации. При этом происходит потребление метаболической энергии в форме АТФ. Неотъемлемой особенностью действия витамина Д на транспортные механизмы является регуляция биосинтеза переносчиков Ca^{2+} белковой природы.

Витамин Д непосредственно повышает матричную активность хроматина клеток эпителия кишечника. При этом увеличивается синтез ядерных РНК. Это индуцирующее действие удается ингибировать актиномицином Д, что свидетельствует о влиянии витамина Д на транскрипцию генетической информации. Важной особенностью является и то, что актиномицин Д блокирует как синтез РНК, так и транспорт Ca^{2+}, стимулированный витамином Д. В связи с этим возник вопрос, какое отношение имеет действие витамина Д на синтетические процессы и проявление его действия на транспорт Ca^{2+}? Различными методами, в том числе и иммунологическими, было выявлено, что витамин Д индуцирует синтез специфического Са-связывающего белка. Этот синтез ингибируется пуромицином и другими ингибиторами трансляции генетической информации. Хотя в настоящее время и не выяснены все аспекты регуляции витамином Д синтеза Са-связывающего белка, можно считать, что до момента связывания и транспорта ионов кальция происходит проникновение витамина Д в форме активного

метаболита (или метаболитов) через цитоплазматическую мембрану, взаимодействие с цитоплазматическим рецептором, транспорт его в связанном состоянии в ядро и взаимодействие с ядерным рецептором. В составе комплекса рецептор-активный метаболит витамин Д взаимодействует с молекулами репрессора (в настоящее время еще не изученного), результатом чего является повышение матричной активности хроматина. То, что синтез РНК в ядрах увеличивается — установленный факт. Однако, какие именно РНК претерпевают изменения, этот вопрос требует дальнейшего уточнения. В конечном итоге осуществляется синтез Ca^{2+}-связывающего белка на рибосомах и непосредственное связывание его с кальцием. Интересно отметить, что приведенная последовательность действия активных метаболитов витамина Д на синтез Са-связывающего белка характерна и для транспорта Na^+, регулируемого другими стероидами. В частности, выяснено, что индуцированный альдостероном синтез РНК, белка и транспорт Na^+ удается блокировать актиномицином Д или пуромицином. И в том, и в другом случае происходит активация генетического материала и индукция синтеза специфических транспортных белков. Таким образом, названный механизм транспорта не является специфичным для витаминов, а скорее всего представляет частный случай в действии стероидов вообще.

Переходя к рассмотрению молекулярных механизмов рахита, следует учитывать, что основная роль витамина Д заключается в регуляции всасывания Ca^{2+} в кишечнике. Витамин Д совместно с паратиреоидным гормоном и тиреокальцитонином ответствен за поддержание уровня кальция и фосфора в крови в концентрациях, оптимальных для нормальной минерализации костной ткани. При рахите наряду с нарушениями в системе регуляции гомеостаза кальция и фосфора наблюдаются выраженные сдвиги в белковом, углеводном и липидном обмене, в гормональном статусе организма, в структуре и функциональной активности биологических мембран. Поэтому упрощенные представления о том, что при рахите следует назначать только витамин Д, требуют дополнений. Если и рассматривать рахит как недостаточность витамина Д, то скорее следует принять, что названная патология связана с нарушением метаболизма стероидов. В частности, нарушение образования активных метаболитов витамина Д может быть причиной снижения скорости всасывания кальция в кишечнике. Действительно, при нарушении функции печени и почек и, как следствие — изменении трансформации витамина Д в активные метаболиты, например, при гепатэктомии, нефроэктомии или при

некоторых видах печеночной и почечной недостаточности, блокируются физиологические эффекты витамина Д. Резистентные к витамину Д рахитоподобные заболевания во многих случаях также могут быть связаны с нарушением биохимических процессов на уровне трансформации молекулы витамина Д в биологически активные метаболиты. В этих случаях, видимо, целесообразно использовать готовые активные метаболиты витамина Д с терапевтической целью. Такая терапия будет оправдана с точки зрения молекулярных механизмов действия витамина Д.

В свете изложенных данных о механизме действия витамина Д представляется возможным оценить сущность токсического эффекта этого витамина. Комплекс морфологических и функциональных сдвигов в различных органах при гипервитаминозе Д может быть обусловлен не только повышенным всасыванием кальция в кишечнике и последующим развитием гиперкальцемии, но и другими биохимическими нарушениями, не связанными непосредственно с усилением физиологического эффекта витамина Д. Об этом свидетельствует и тот факт, что существует какой-то лимитирующий фактор в скорости образования метаболически активных форм витамина Д, которые ответственны за проявление его физиологического эффекта.

Важная роль в механизме токсического действия витамина Д может принадлежать индуцирующему эффекту высоких доз последнего в переокислении липидных компонентов биологических мембран с нарушением их структуры и функциональной активности и образованием весьма токсичных соединений типа перекисей липидов и свободных радикалов. В связи с этим при гипервитаминозе Д оправдано применение с терапевтической целью антиоксидантов, в частности витамина Е и других.

Следовательно, передозировка витамина Д в организме не является безвредной и может вызвать тяжелые сдвиги с нарушением функций сердечно-сосудистой системы, печени, почек и других жизненно-важных органов в результате нарушения их структуры с последующим развитием кальцификации. Кроме того, высокие дозы витамина Д обладают тератогенным и эмбриотоксическим действием. Поэтому назначение высоких доз витамина Д, равно как и его применение вообще, должно быть строго оправдано и контролируемо.

ЛИТЕРАТУРА

Алексеенко В. П., 1964. Влияние витамина $Д_2$ на развитие липоидоза аорты и венечных артерий сердца у детей. «Архив патол.», т. 26, № 3, стр. 47.

Алешин Б. В., 1969. Тиреокальцитонин — гипокальцемизирующий гормон щитовидной железы. «Успехи совр. биол.», т. 67, вып. I, стр. 80.

Алешин Б. В., 1970. Новые данные о тиреокальцитонине. «Успехи совр. биол.», т. 69, вып. I, стр. 158.

Арешкина Л. Я., Букин В. Н., Ерофеева Н. Н., Скоробогатова Е. П., 1957. Изменение белково-стериновых компонентов сыворотки крови при экспериментальном рахите и гипервитаминозе Д. «Биохимия», т. 22, № 1—2, стр. 384.

Бавина М. В., 1952. Влияние витамина $Д_2$ на холестериновый и экспериментальный атеросклероз. Тр. АМН СССР, т. 20, стр. 122.

Бауман В. К., 1968. Кальций и фосфор, обмен и регуляция у птиц. Рига.

Бауман В. К., 1969. Функция эндокринных желез цыплят при развитии рахита и при Д-гипервитаминозе. В сб.: «Физиол. активные компоненты питания животных». Рига, стр. 67.

Бауман В. К., 1972. Современные представления о механизме действия и обмена витамина Д в организме животных. «Прикл. биохим. и микробиол.», т. 8, № 2, стр. 131.

Бауман В. К., Валиниеце М. Ю., 1971. Кальций-связывающий белок в различных органах рыб. «Изв. АН ЛатвССР», № 6, стр. 137.

Белкина Л. М., 1964. К вопросу о потребности в витамине Д детей грудного возраста. «Вопр. питания», т. 23, № 5, стр. 63.

Белкина Л. М., 1965. Влияние витамина Д на некоторые показатели обмена кальция и холестерина у детей грудного возраста. В сб.: «Матер. симпоз. по Д-гипервитаминозу». М., стр. 7.

Белкина Л. М., 1966. О некоторых причинах повышенной чувствительности к витамину Д у детей при искусственном вскармливании. «Педиатрия», № 6, стр. 38.

Белобородова Л. И., Кедо А. А., 1961. Клиническая картина и лечение Д-гипервитаминоза у детей раннего возраста. «Вопр. охр. мат. и дет.», № 1, стр. 48.

Белявская В. В., Вендт В. П., 1967. Новые данные о биологической активности люмистерина. В сб.: «Материалы VI научной сессии ВНИИВС». М., стр. 74.

Березовский В. М., 1959. Химия витаминов. М.

Бессонова М. Н., 1960. Рахит. М.

Блажеевич Н. В., 1967. Действие витамина $Д_2$ на мембрану эритроцита. В сб.: «Матер. VI научн. сессии ВНИИИВ МЗ СССР». М., стр. 5.

Блажеевич Н. В., 1969. Роль перекисей в механизме токсического действия витамина $Д_2$. Автореф. канд. дисс. М.

Блажеевич Н. В., Исаева В. А., Спиричев В. Б., 1965. К механизму токсического действия витамина Д: действие витамина на структуру и функциональную активность липопротеиновых мембран клеток и клеточных органелл. В сб.: «Материалы симпозиума по Д-гипервитаминозу». М., стр. 2.

Блажеевич Н. В., Спиричев В. В., 1966а. Взаимодействие эргокальциферола (витамин $Д_2$) с оксигемоглобином и цитохромом С. «Биохимия», т. 31, № 6, стр. 1100.

Блажеевич Н. В., Спиричев В. Б., 1966б. Действие витамина Д на АТФ-азную активность и стабильность мембраны эритроцитов. «Вопр. мед. химии», т. 12, вып. 4, стр. 424.

Боровягин В. И., 1967. Современное представление о структуре клеточных мембран. «Цитология», т. 9, № 5, стр. 505.

Боровягин В. Л., 1969. Биологические ультраструктуры. М., т. 46.

Боровягин В. Л., 1971. Клеточные мембраны. «Биофизика», т. 16, № 4, стр. 746.

Брискин А. И., 1971. Эндокринная регуляция обмена кальция в организме. В сб.: «Физиология человека и животных, серия биологич.». М., стр. 3.

Вендт П. В., 1971. Обменно-активные формы витамина Д. В сб.: «Витамины». Киев, вып. 6, стр. 5.

Вишневский Ю. Б., 1965. О гипервитаминозе Д у грудных детей. «Педиатрия», № 7, стр. 82.

Вишневский Ю. Б., 1967. К вопросу об отдаленных последствиях гипервитаминоза Д. «Сов. медицина», № 5, стр. 132.

Вишневский Ю. Б., 1970. О функциональном состоянии печени при гипервитаминозе $Д_2$ у детей. «Педиатрия», № 1, стр. 75.

Владимиров Ю. А., Арчаков А. И., 1972. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.

Володина Н. Н., 1966. Белковые фракции сыворотки крови у детей, страдающих рахитом. В сб.: «Тр. 2-го Всероссийского съезда детских врачей». М., стр. 108.

Володина Н. Н. 1967. Белковый состав сыворотки крови у детей, больных рахитом, при лечении витамином $Д_2$ и видеином $Д_3$. В сб.: «Тр. Воронежского мед. ин-та». Воронеж, т. 59, стр. 160.

Волоховская З. С., 1960. Острый гипервитаминоз $Д_2$. «Советская мед.», № 4, стр. 126.

Воскресенский О. Н., Левицкий А. П., 1970. Перекиси липидов в живом организме. «Вопр. мед. химии», т. 16, № 6, стр. 563.

Гарсеванишвили Т. И., 1958. Распределение радиометионина в тканях при рахите. В кн.: «Сборник трудов научно-практических конференций врачей Закавказской железной дороги». Тбилиси, стр. 332.

Гельман Н. С., 1969. Изучение структуры биологических мембран при помощи фрагментации детергентами. «Успехи совр. биол.», т. 68, № 4, стр. 3.

Герценберг Е. Я., 1929. О некоторых изменениях, возникших

в организме под влиянием облученного эргостерина и их отношение к атеросклерозу. «Вопр. совр. мед.», № 9, стр. 1008.

Голиков К. К., 1967. Влияние богатых фосфором диет с разным количеством жира и витамина Д на остеогенез растущих белых крыс. «Вопр. питания», т. 26, № 4, стр. 24.

Гроздов С. П., 1968. Изменение содержания Са в тканях у кроликов под действием ионизирующей радиации и веществ, влияющих на окислительное фосфорилирование. «Радиобиол.», т. 8, № 1, стр. 23.

Гусейнова Л. М., 1968. Эффективность применения кортикотерапии при экспериментальном рахите. «Изв. АН АзербССР, сер. биол.», № 2, стр. 119.

Давыдова С. А., 1967. Поверхностные мембраны и их роль в биохимических процессах в клетке. «Цитология», т. 9, № 10, стр. 1248.

Даценко З. М., 1969. Про біологічну активність продуктів фотоперетворення стеринів шкіри щурів. «Укр. біохім. ж.», т. 41, № 4, стр. 418.

Дмитриева Г. Ш., 1965. К вопросу о состоянии белкового обмена при рахите. В сб.: «Первая конф. республиканской детской клинич. б-цы». (Тезисы и доклады). Рига, стр. 46.

Домбровская Ю. Ф., 1963. Витамины в педиатрии. М.

Доти П., 1961. Современные проблемы биофизики. М.

Драгнева Л. А., Исаева В. А., Блажеевич Н. В., Спиричев В. Б., 1966. Действие витамина $Д_2$ на АТФ-азную активность мозговой ткани. «Вопр. питания», т. 25, № 1, стр. 24.

Дэвидсон Дж., 1968. Биохимия нуклеиновых кислот. М.

Ефимова Т. Г., 1959. Экспериментальная гипертония, полученная введением витамина Д. Докт. дисс. Харьков.

Журикова Г. А., Блажеевич Н. В., Спиричев В. Б., 1971. К изучению механизма действия витамина Д. Влияние витамина $Д_2$ на переокисление ненасыщенных липидов. «Вопр. питания», № 15, стр. 20.

Зевальд Л. О., 1958. Влияние длительного введения больших доз витамина Д на условно-рефлекторную деятельность. «Физиол. ж. СССР», т. 44, № 10, стр. 984.

Зуева З. В., 1965. Клинические проявления острого $Д_2$-гипервитаминоза. В сб.: «Матер. симпоз. по Д-гипервит». М., стр. 10.

Кавтарадзе Т. А., 1969. Нуклеиновые кислоты в некоторых органах при экспериментальном рахите. Автореф. канд. дисс. Тбилиси.

Касавина Б. С., Кольчинская Т. А., Зенкевич Г. Д., 1970. Мукополисахариды костной и хрящевой ткани в норме и патологии. «Успехи совр. биол.», т. 69, вып. 3, стр. 353.

Коварская Т. Б., 1965. Об индивидуализации назначения витамина Д. «Вопр. охр. мат. и дет.», № 11, стр. 83.

Лавров Б. А., Терентьева Е. Л., 1963. Реакция организма на введение больших доз витамина $Д_2$. «Вестн. АМН СССР», № 8, стр. 54.

Лавров Б. А., Терентьева Е. Л., 1965. Цикл Кребса и токсическое действие витамина Д. В сб.: «Матер. симпоз. по Д-гипервитаминозу». М., стр. 1.

Лавров Б. А., Терентьева Е. Л., Ермилова Л. И., 1963. Реакция организма на введение больших доз витамина $Д_2$ (экспериментальные данные). В сб.: «Матер. 5-й научн. сессии НИИ витаминологии». М., стр. 24.

Лукьянова Е. М., Вендт В. П., 1965. Депонирование витамина Д в плаценте. «Вопр. охр. мат. и дет.», т. 10, № 4, стр. 55.

Любошиц Э. С., 1970. Роль генетических структур в реализации действия витамина Д. В сб.: «Актуальн. вопр. здравоохр. и практ. медицины». Киев, стр. 80.

Маркович Н. А., 1969. Поражение сердечно-сосудистой системы

у детей раннего возраста при гипервитаминозе $Д_2$. «Вопр. питания», т. 28, № 4, стр. 16.

Миргазизов М. З., 1965. Вопросы гистопатологии нижнечелюстных костей и зубов белых крыс при экспериментальном рахите. «Стоматология», № 6, стр. 30.

Ньюман У., Ньюман М., 1961. Минеральный обмен кости. М.

Оснач В. С., 1971. Действие стероидов на физико-химические свойства нуклеиновых кислот. Автореф. канд. дисс. Рязань.

Паламарчук В. И., Вендт В. П., 1969. Про антирахітичні речовини молока. «Укр. біохім. ж.», т. 41, № 2, стр. 201.

Певзнер Е. С., 1957а. Экспериментальный Д-гипервитаминоз. В кн.: «Сб. научн. работ Белорус. кожно-венер. ин-та». Минск, № 5, стр. 162.

Певзнер Е. С., 1957б. Биохимическое исследование при экспериментальном Д-гипервитаминозе. В кн.: «Сб. научн. работ Белорус. кожно-венер. ин-та». Минск, № 5, стр. 233.

Певзнер Е. С., 1966. Степень кальцификации органов и тканей под влиянием массивных доз витамина $Д_2$. «Врач. дело», № 3, стр. 44.

Петрова Э. А., Богословский Н. А., Гордеева Н. П., 1970. Биологическая активность эфиров эргокальциферола и холекальциферола. «Вопр. питания», т. 29, № 6, стр. 19.

Пляскова Л. М., 1965. К вопросу о гипервитаминозе Д у грудных детей. «Педиатрия», № 5, стр. 41.

Пляскова Л. М., 1966. О поражении сердечно-сосудистой системы при гипервитаминозе $Д_2$ у детей раннего возраста. «Педиатрия», № 7, стр. 39.

Пляскова Л. М., 1967. О поражении почек при гипервитаминозе $Д_2$ у детей раннего возраста. «Вопр. охр. мат. и дет.», № 2, стр. 7.

Пляскова Л. М., 1968. Анемия при Д-гипервитаминозе у детей раннего возраста. «Педиатрия», № 12, стр. 49.

Пляскова Л. М., Сидорова К. А., Козловцева И. Г., 1962. О гипервитаминозе Д у грудных детей. «Педиатрия», № 4, стр. 61.

Покровский А. А., Конь И. Я., Натансон А. О., Кравченко Л. В., 1971. Исследование активности некоторых ферментов печени и почек крыс при $Д_2$-гипервитаминозе и экспериментальном рахите. «Вопр. питания», т. 30, № 3, стр. 25.

Раскин И. М., 1968. Кальций крови и мочи при остром $Д_2$-гипервитаминозе у взрослых людей. В сб.: «Матер. совещ. по химии и биохимии вит. Д». Киев, стр. 35.

Рассолова М. А., 1964. Д-гипервитаминоз. В кн.: «Рахит». М., стр. 23.

Селье Г., 1960. Очерки об адаптационном синдроме. М.

Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Майский А. И., 1971а. Молекулярные аспекты действия стероидных гормонов. М.

Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Майский А. И., Оснач В. С., Саксонов Н. П., Середенин С. Б., Сочугов Б. М., Султанов И. А., Чермных Н. С., Трипольская Л. Д., Чубарова А. В., 1971б. Регуляция стероидными гормонами функционального состояния органов-мишеней. В кн.: «Материалы к расширенному заседанию научного совета по общей и медицинской генетике МЗ УССР». Киев, стр. 32.

Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Майский А. И., Саксонов Н. П., Кольчинская Т. А., Чермных Н. С., Султанов И. А., Трипольская Л. Д., Чубарова А. В., 1971в. Молекулярные механизмы действия стероидных гормонов на метаболизм лимфоидной ткани. В кн.: «Иммунодепрессия при аллотрансплантации». Ташкент, стр. 154.

Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Майский А. И., Саксонов Н. П., Султанов И. А., Халилов Э. М., 1971г. Влияние стероидных гормонов на транспорт предшественников нуклеиновых кислот и белков. В кн.: «Структура и функция биологических мембран». М., стр. 134.

Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Саксонов Н. П., 1971д. Влияние гидрокортизона, дезоксикортикостерон-ацетата, тестостерон-пропионата, эстрадиол-дипропионата на динамику включения глицина-1-C^{14} в субклеточные фракции клеток печени. «Бюлл. экспер. биол. и мед.», т. 71, № 7, стр. 36.

Сергеев П. В., Сейфулла Р. Д., Осняч В. С., Сочугов Б. М., 1972. Исследование действия стероидов на вторичную структуру ДНК и ДНП. «Бюлл. экспер. биол. и мед.», № 3, стр. 34.

Сергеев П. В., Шарманов Т. Ш., Тажибаев Ш. С., 1973. Динамика включения глицина-1-C^{14} в белки гомогенатов и субклеточных фракций органов крыс под влиянием витамина $Д_2$. «Фармакол. и токсикол.», т. 36, № 5, стр. 577.

Скулачев В. П., 1962. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М.

Смирнов М. И., Щипицына Л. П., 1969. Влияние токсических доз витамина $Д_2$ на окисление и фосфорилирование в митохондриях почек нормальных и адреналэктомированных крыс in vitro. «Вопр. мед. химии», т. 15, вып. 2, стр. 166.

Спиричев В. Б., 1967. К вопросу о механизме действия витамина Д. В сб.: «Матер. VI научн. сессии ВНИИВ МЗ СССР». М., стр. 54.

Спиричев В. Б., 1971. Изучение механизма токсического действия витамина $Д_2$. В сб.: «Витамины», вып. 6. Киев, стр. 64.

Спиричев В. Б., Блажеевич Н. В., 1968а. К вопросу о механизме гемолитического действия витамина $Д_2$. Образование перекисей липидов. «Вопр. мед. химии», т. 14, № 4, стр. 371.

Спиричев В. Б., Блажеевич Н. В., 1968б. К вопросу о механизме подавляющего действия витамина $Д_2$ на АТФ-азную активность. «Биохимия», т. 33, вып. 6, стр. 1260.

Спиричев В. Б., Блажеевич Н. В., Зиновьева Т. А., Илюнцева С. К., 1968. Влияние высоких доз витамина $Д_2$ на эритропоэз. «Бюлл. экспер. биол. и мед.», т. 66, № 11, стр. 32.

Спиричев В. Б., Блажеевич Н. В., Исаева В. А., 1965. К вопросу о биохимических основах Д-гипервитаминоза. В сб.: «Матер. респ. конф. по вопр. здорового и больного организма, посвящ. 25-летию Советской Литвы». Вильнюс, стр. 79.

Спиричев В. Б., Блажеевич Н. В., Раскин И. М., 1969. Биохимическая диагностика Д-гипервитаминоза и его лечение токоферол-ацетатом. «Вопр. мед. химии», № 2, стр. 123.

Спиричев В. Б., Зиновьева Т. А., 1968. Влияние витамина $Д_2$ на пероксидацию ненасыщенных липидов. В сб.: «Матер. совещ. по химии и биохимии витаминов Д и их применение в медицине и животноводстве». Киев, стр. 38.

Спиричев В. Б., Милосердова А. Г., 1968. Влияние витамина $Д_2$ на структуру и свойства митохондриальной мембраны. В сб.: «Матер. совещ. по химии и биохимии витаминов Д и их применение в медицине и животноводстве». Киев, стр. 37.

Спиричев В. Б., Милосердова А. Г., Зиновьева Т. А., Богословский Н. А., Кожина З. П., 1971. Превращения эргокальциферола в водной среде. «Биохимия», т. 36, вып. 3, стр. 489.

Смирнов М. И., Щипицына Л. П., 1969. Влияние токсических доз витамина $Д_2$ на окисление и фосфорилирование в митохондриях по-

чек нормальных и адреналэктомированных крыс in vitro. «Вопр. мед. химии», т. 15, вып. 2, стр. 166.

Струков В. И., 1967. О гипервитаминозе Д. «Здравоохр. Казахстана», № 4, стр. 63.

Студницин А. А., Маслов П. Е., 1970. К вопросу о применении видеина — витамина $Д_3$ в детской дермато-венерологической практике. «Вестник дерматол. и венер.», т. 44, № 2, стр. 25.

Тажибаев Ш. С., 1971. Исследование биосинтеза белка в печени и красном костном мозге крыс под влиянием витамина $Д_2$. В кн.: «Первая межвузовская конференция молодых ученых» (матер. докл.). М., стр. 159.

Тажибаев Ш. С., 1972а. Транспорт H^3-витамина $Д_3$ через биологические мембраны. В кн.: «Биологические мембраны в норме и патологии». М., стр. 58.

Тажибаев Ш. С., 1972б. Динамика включения P^{32} в ядерную РНК слизистой тонкого кишечника крыс при экспериментальном гипервитаминозе $Д_2$. «Здравоохр. Казахстана», № 6, стр. 33.

Трошин А. С., 1956. Проблема клеточной проницаемости. М.—Л.

Тур А. Ф., 1965. Гипервитаминоз Д у детей. В сб.: «Материалы симпозиума по Д-гипервитаминозу». М., стр. 5.

Тур А. Ф., 1966. Рахит. Л.

Уголев Л. М., Кассиль В. Г., 1961. Физиология аппетита. «Успехи совр. биол.», т. 51, вып. 3, стр. 352.

Уотерс У., 1966. Механизм окисления органических соединений. М.

Физер Л., Физер М., 1964. Стероиды. М.

Хвуль А. М., 1960. К вопросу о депонировании витамина Д в организме. «Педиатрия», № 9, стр. 33.

Хвуль А. М., Гусовский Я. М., Вендт В. П., 1961. К вопросу о развитии гипервитаминоза Д при применении синтетических препаратов витамина Д. «Педиатрия», № 11, стр. 34.

Хвуль А. М., Лукьянова Е. М., 1965. Условия возникновения гипервитаминоза Д. В сб.: «Материалы симпозиума по Д-гипервитаминозу». М., стр. 7.

Чуваева А. В., 1969. Роль гипофиза в реакции надпочечников на введение токсических доз витаминов А и Д. Автореф. канд. дисс. М.

Чуваев А. В., 1971. Роль гипофиза в изменении образования кортикостероидов под влиянием токсических доз витаминов А и $Д_2$. «Вопр. мед. химии», т. 17, вып. I, стр. 12.

Шарманов Т. Ш., 1970. Вопросы витаминологии и гигиены питания в Казахстане. Алма-Ата.

Шахтер Д., 1961. Витамин Д и активный перенос кальция. В сб.: «Рефер. сообщ. на 5 междунар. биохимич. конгрессе». М., т. 1, стр. 515.

Шевлягина М. И., 1965. Особенности токсического действия витамина Д у взрослых. В сб.: «Материалы симпозиума по Д-гипервитаминозу». М., стр. 8.

Шевлягина М. И., Гилунова Н. И., Гордон Р. И., Раскин И. М., Пипко А. С., 1968. Д-гипервитаминоз у взрослых. «Клин. мед.», т. 46, № 1, стр. 31.

Шубина Л. И., 1970. Исследование влияния витамина Д на кальцификацию костной ткани в опытах in vitro. Автореф. канд. дисс. Киев.

Шубина Л. И., Вендт В. П., 1970. Влияние витамина $Д_3$ на кальцификацию костной ткани цыплят в опытах in vitro. «Докл. АН СССР (сер. биол.)», т. 191, № 2, стр. 480.

Щипицына Л. П., 1965. Влияние $Д_2$-витаминной интоксикации на разобщение окислительного фосфорилирования. В сб.: «Материалы симпозиума по Д-гипервитаминозу». М., стр. 3.

Щипицына Л. П., 1966. Влияние токсических доз витамина $Д_2$ на разобщение процесса окислительного фосфорилирования. «Бюлл. эксперим. биол. и мед.», т. 62, № 9, стр. 60.
Щипицына Л. П., 1967а. Окисление и фосфорилирование в условиях $Д_2$-витаминной интоксикации. Автореф. канд. дисс. М.
Щипицына Л. П., 1967б. АТФ-азная активность и дыхание митохондрий в условиях $Д_2$-витаминной интоксикации. «Вопр. мед. химии», т. 13, вып. 6, стр. 601.
Юзеева М. С., 1961. Белки крови при рахите у детей. В кн.: «Материалы 4 научной сессии НИИ витаминологии МЗ СССР». М., стр. 113.
Юзеева М. С., 1963. Белки крови при рахите. «Казанский мед. ж.», № 4, стр. 63.
Якубчик Ф. М., Зингер Т. И., 1960. Проблема гипервитаминоза Д у новорожденных. «Педиатрия», т. 38, № 9, стр. 37.

Adams T. H., Norman A. W., 1970. Studies on the mechanism of action of calciferol. I. Basic parametrs of vitamin D-mediated calcium transport. «J. Biol. Chem.», v. 245, № 17, p. 4 421.
Adams T. H., Wong R. G., Norman A. W., 1969. Vitamin D-mediated calcium transport. «Fed. Proc.», v. 28, p. 759.
Adams T. H., Wong R. G., Norman A. W., 1970. Studies on the mechanism of action of calciferol. II. Effects of the polyene antibiotic, filipin, on vitamin D-mediated calcium·transport. «J. Biol. chem.», v. 245, № 17, p. 4 432.
Aliapoulios M. A., Bernstein D. S., Balodimos M. C., 1969. Thyrocalcitonin. Its role in calcium homeostasis. «Arch. Intern. Med.», v. 123, № 1, p. 88.
Aliapoulios M. A., Munson P. L., 1965. Thyrocalcitonin. «Surg. Forum», v. 16, p. 55.
Angus T. C., Askew F. A., Bourdiilon R. B., Bruce H. M., Callow R. K., Fischmann C., Philpot J. St. L., Webster T. A., 1931. A crystalline antirachitic substance. «Proc. Roy. Soc.», (London), v. 108, p. 340.
Au W. Y. W., Raisz L. G., 1965. Effect of vitamin D and dietary calcium on parathyroid acitivity. «Amer. J. Physiol.», v. 209, p. 637.
Au W. Y. W., Raisz L. G., 1967. Restoration of parathyroid hormone responsiveness in vitamin D deficient rats by parenteral calcium or dietary lactose. «J. Clin. Invest.», v. 46, p. 1572.
Aurbach G. D., Potts J. T., Chase L. R., Melson G. L., 1969. Polypeptide hormones and calcium metabolism. «Annals Internat. Med.», v. 70, p. 1243.
Avioli L. V., Birge S., Lee S. M., Slatopolsky E., 1968. The metabolic fate of vitamin D_3-H^3 in chronic renal failure. «J. Clin. Invest.», v. 47, p. 2, 239.
Avioli L. V., Lee S. W., Mc Donald J. E., Lund J., De Luca H. F., 1967. Metabolism of vitamin D_3-H^3 in human subjects: distribution in blood, bile, feces and urine. «J. Clin. Invest.», v. 46, № 6, p. 983.
Balestreri R., Basso F., Savioli. F., 1963. Le modificazioni della corticosteroidogenesi indotte nel zatto dall'ipervitaminosi sperimentale D_3. «Arch. E Maragliano patol. e Clin.», v. 19, № 6, p. 701.
Bauer J. M., Freyberg R. H., 1946. Vitamin D intoxication with metastatic calcification. «J. Amer. Med. Ass.», v. 130, p. 1208.
Baylink D., Stauffer M., Wergedal J., Rich C., 1970.

Formation, mineralization and resorption of bone in vitamin D deficient rats. «J. Clin. Invest.», v. 49, p. 1122.

Bekemeier H., 1958. Versuche zur maximalen antirachitischen UV-Aktivierung isolierter menschlicher Haut. «Acta biol. med. Germ.», Bd. 1, № 6, S. 756.

Bekemeier H., 1969. Hautfarbe und Kutane Vitamin-D-Photosynthese. «Dtsch. med. Wschr.», Bd. 944, S. 185.

Bell N. H., Bryan P., 1965. On the metabolism of C^{14}-vitamin D_3 in the rat. «J. Lab. Clin. Med.», v. 66, № 5, p. 852.

Berg H. C., 1969. Sulfanilic acid diazonium salt: a label for outside of the human erythrocyte membrane. «Biochim. et Biophys. Acta», v. 183, p. 65.

Bernstein D., Kleeman C. R., Dowling J. T., Maxwell M. H., 1962. Steatorrhoea, functional hypoparathyroidism and metabolic bone defect. «Arch. Intern. Med.», v. 109, p. 97.

Bernstein S., Sax K. J., 1951. $\Delta^{5,7}$-steroids. (1). 7-dehydrocholesteryl mercaptan. «J. org. Chem.», v. 16, p. 685.

Bertolotti E., DePra M., 1963. Relations between oxidative phosphorylation, vitamin D and parathyroid hormone at the level of the renal tubule. «Pediat. Naples.», v. 71, p. 1 152.

Beuren A. J., Apitz J., Stoerner J., Kaiser B., 1966. Vitamin D-hypercalcamische Herrund Gefasserkrankung. «Monatschr. Kinderheilk.», Bd. 114, S. 457.

Billitteri A., Gounelle J. C., Sichel G., Cambria A., 1971. Action du cholécalciférol à haute dose sur les mitochondries hépatiques et renales du rat. «C. r. Soc. Biol.», v. 165, № 1, p. 29.

Bills C. E., 1954. Chemistry of vitamin D. In: «The vitamins». N. Y., v. II., p. 132.

Blobel G., Potter V. R., 1966. Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. «Science», v. 154, p. 1 662.

Blomstrand R., Forsgren L., 1967. Intestinal absorption and esterification of vitamin D_3-1,2-H^3 in man. «Acta Chem. Scand.», v. 21, p. 1 662.

Blondin G. A., Kulkarni B. D., Nes W. R., 1967. A study of the origin of vitamin-D from 7-dehydrocholesterol in fish. «Compar. Biochem. and Physiol.», v. 20, № 2, p. 379.

Blumberg A., Aebi H., Hurni H., Schonholzer G., 1960. Das Verteilungmuster von C^{14}-Ergocalciferol (Vitamin D_2) bei der Ratte und beim Rhesusaffen. «Helv. Phys. Pharmac. Acta», Bd. 18, S. 56.

Blunt J. W., De Luca H. F., 1969. The synthesis of 25-hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D_3. «Biochemistry», v. 8, № 2, p. 671.

Blunt J. W., De Luca H. F., Schnoes H. K., 1968a. 25-Hydroxycholecalciferol: a biologically active metabolite of cholecalciferol. «Chem. Commun.», v. 14, p. 80.

Blunt J. W., De Luca H. F., Schnoes H. K., 1968b. 25-Hydroxycholecalciferol. A. biologically active metabolite of vitamin D^3. «Biochemistry», v. 7, № 10, p. 3 317.

Blunt J. W., Tanaka Y., De Luca H. F., 1968c. The biological activity of 25-hydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D_3. «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.», v. 61, № 4, p. 1503.

Blunt J. W., Tanaka Y., De Luca H. F., 1968d. The biological activity of 25-hydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D_3. «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.», v. 61, № 2, p. 717.

Borle A. B., 1967. Membrane transfer of calcium. «Clin. Orthopaed.», № 52, p. 267.

Bosman H. B., Chen P. S., 1966. Actinomycin D inhibition of vitamin D-and dihydrotachysterol-induced responses in the chick. «J. Nutr.», v. 90, № 4, p. 405.
Boyer P., Spar A., Gerbeaux S., 1956. L'Amino-acidurie du rachitisme commun et de la tetanie du nourission. «Semaine d'Hopit. Ann. Med.», v. 5, p. 254.
Boyle S. T., Gray R. W., De Luca H. F., 1971. Regulation by calcium of in vivo synthesis of 1,25-dihydroxycholecalciferol and 21, 25-dihydroxycholecalciferol. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», v. 68, № 9, p. 2131.
Branton D., 1969. Membrane structure. «Ann. Rev. Plant. Physiol.», v. 20, p. 209.
Briggs H. M., 1961. Vitamin toxicity and the hypervitamines. «New Lealaid. Sci. Rev.», v. 19, p. 38.
Brockmann H., 1937. Zur Frage eines quantitativen Wirkungsunterschiedes der autirachitischen Vitamine D_2 und D_3 beim Sängling. «Klin. Wschr.», Bd. 16, № 40, S. 1 383.
Brodehl J., Kaas W. P., Weber H., 1971. Vitamin D deficiency rickets: renal handling of phosphate and free amino acids. «Pediat. Res.», v. 5, № 11591, p. 604.
Bruchovsky N., Wilson J. D., 1968. Conversion of testosteron to 5α-androstan-17β-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. «J. Biol. Chem.», v. 243, p. 2 012.
Buchanan G. D., 1961. Parathyroid influence on renal excretion of calcium. In.: «The parathyroids». Eds. R. O. Greep and R. V. Talmage. N. Y., p. 334.
Bugnon C., Maurat J. P., Lenys D., Moreau N., Roussele t F., 1967. Etude de l'origins cytologique de la thyrocalcitonine chez des Rats en hypervitaminose D. «Compt. Rend. Soc. Biol.», v. 161, p. 2363.
Butcher R. W., Robinson G. A., Hardman J. G., Sutherland E. W., 1968. The role of cyclic AMP in hormone actions. «Advances Enzyme Regul.», v. 6, p. 357.
Bygrave F. L., Bücher T., 1968. The energy-dependent incorporation of serine into phospholipids of isolated rat liver mitochondria. «Eur. J. Biochem.», v. 6, p. 256.
Bygrave F. L., Kaiser W., 1968. Energy reguirements in the incorporation of choline by isolated rat liver mitochondria. «Eur. J. Biochem.», v. 4, p. 578.
Callow R. F., Kodicek E., Thompson G. A., 1966. Metabolism of tritiated vitamin D. «Proc. Roy. Soc.». (London), ser. B, v. 164, p. 1.
Cambria A., Billitteri A., 1970. Modificazioni biochemiche e morfologiche dei miticondri epatici del ratto in ipervitaminosi D_3. «Boll. Soc. ital. biol. sper.», v. 46, № 13—14, p. 621.
Capen C. C., Koestner A., Cole C. R., 1965. The ultrastructure, histopathology and histochemistry of the parathyroid glands of pregnant and nonpregnant cown fed a high level of vitamin D. «Lab. Invest.», v. 14, p. 1809.
Capen C. C., Young D. M., 1969. Fine structural alterations in thyroid parafollicular cells in cows in response to experimental hypercalcemia induced by vitamin D. «Amer. J. Pathol.», v. 57, p. 365.
Care A. D., Cooper C. W., Duncan T., Orimo H., 1968. A study of thyrocalcitonin secretion by direct measurement of in vivo secretion rates in pigs. «Endocrinology», v. 83, p. 161.
Carlsson A., 1951. Metabolism of radiocalcium in relation to calcium intake on young rats. «Acta Pharmac. Tox.», v. 7 (suppl. I), p. 1.
Carlsson A., 1952. Tracer experiments on the effect of vitamin D on the skeletal metabolism of calcium and phosphorus. «Acta Physiol. Scand.», v. 26, p. 212.

Carlsson A., 1954. The cause of hypophosphatemia and hypocalcemia in vitamin D deficiency. «Acta Physiol. Scand.», v. 31, p. 308.

Chalk E. J., Kodicek E., 1961. The association of C^{14}-labeled vitamin D_2 with rat serum proteins. «Biochem. J.», v. 79, p. 1.

Chaplin J. H., Clark L. D., Ropes W. M., 1951. Vitamin D intoxication. «Amer. J. Med. Sci.», v. 221, p. 369.

Chapman D., 1968. Biological Membranes. N. Y.

Chase L. R., Aurbach G. D., 1968a. Activation of skeletal adenyl cyclase by parathyroid hormone in vitro. In: «Abstracts of brief communications, 3rd int. Endocrine Congress». Amsterdam, Excerpta Med. Found., p. 87.

Chase L. R., Aurbach G. D., 1968b. Cyclic AMP and the mechanism of action of parathyroid hormone. In: «Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin (Calcitonin)». Eds. R. V. Talmage and L. F. Belanger. Amsterdam, Excerpta Med. Found., p. 247.

Cheesman E. M., Copping A. M., Prebl P. M., 1966. Early changes in enzyme activity during the development of and recovery from vitamin D deficiency in the rat. «Brit. J. Nutr.», v. 20, № 3, p. 413.

Chen P. S., Bosman H. B., 1964. Effects of vitamins D_2 and D_3 on serum calcium and phosphorus in rachitic chicks. «J. Nutr.», v. 83, № 2, p. 133.

Chen P. S., Lane K., 1965. Serum protein bindung of vitamin D_3. «Arch. Biochem. and Biophys.», v. 112, № 1, p. 70.

Chen P. S., Neuman W. F., 1955. Renal excretion of calcium by the dog. «Amer. J. Physiol.», v. 180, p. 623.

Chen P. S., Terepka A. R., Lane R., Marsh A., 1965. Studies of the stability and extractability of vitamin D. «Analyt. Biochem.», v. 10, p. 421.

Chen P. S., Terepka A. R., Overslangn C., 1962. Hypercalcemic and hyperphosphatemic actions of dihydrotachysterol, vitamin D_2 and hytakerol (AT-10) in rats and in dogs. «Endocrinology», v. 70, № 6, p. 815.

Chen T. C., Weber J. C., De Luca H. F., 1970. On the subcellular location of vitamin D metabolites in intestine. «J. Biol. Chem.», v. 245, № 15, p. 3 776.

Chisolm J., Harrison H. F., 1962. Aminoaciduria in vitamin D deficiency states in premature infants and older infants with rickets. «J. Pediatrics», v. 60, № 2, p. 206.

Chisolm J. J., Harrison H. C., Eherlein W. B., Harrison H. E., 1955. Amino-aciduria, hypophosphatemie and rickets in lead poisoning. «Amer. J. Dis. Child.», v. 89, № 2, p. 159.

Clark J., Basset C. A., 1962. The amelioration of hypervitaminosis D in rats with vitamin A. «J. Exp. Med.», v. 115, p. 147.

Clark K., Smith M. K., 1964. Effects of hypervitaminosis A and D on skeletal metabolism. «J. Biol. Chem.», v. 239, p. 1 266.

Constantinides P., 1963. Rapid production of atherosclerosis in the rat. «Circulation», v. 28, p. 653.

Copp D. H., 1969a. Endocrine control of calcium homeostasis. «J. Endocrinol.», v. 43, № 1, p. 137.

Copp D. H., 1969b. Calcitonin and parathyroid hormone. «Ann. Rev. Pharmacol.», v. 9, p. 327.

Corradino R. A., Wasserman R. H., 1968. Actinomycin D inhibition of vitamin D-3-induced calcium-binding protein (CaBP) formation in chick duodenal mucosa. «Arch. Biochem. Biophys.», v. 126, p. 957.

Corradino R. A., Wasserman R. H., 1971. Vitamin D_3: induction of calcium binding protein in embryonic chick intestine in vitro. «Science», v. 172, № 3 984, p. 731.

Corradino R. A., Wasserman R. H., Pubolz M. H., Cang S. I., 1968. Vitamin D_3 induction of a calcium-binding protein in the uterus of the laying hen. «Arch. Biochem. Biophys.», v. 125, № 1, p. 378.

Cossimos T., Tsenghi C., Michael S., Liaromati A., Metaxotou K., 1963. Continuous intravenous infusion of calcium in vitamin D-deficient rickets. «Pediatrics», v. 31, p. 272.

Cousins R. J., De Luca H. F., Gray R. W., 1970a. Metabolism of 25-hydroxycholecalciferol in target and nontarget tissues. «Biochemistry», v. 9, № 19, p. 3 649.

Cousins R. J., De Luca H. F., Suda T., Chen T., Tanaka Y., 1970b. Metabolism and subcellular location of 25-hydroxycholecalciferol in intestinal mucosa. «Biochemistry», v. 9, № 6, p. 1 453.

Cramer C. F., 1965. Sites of calcium absorption and the calcium concentration of gut contents in the dog. «Can. J. Physiol. Pharmacol.», v. 43, p. 75.

Cramer C. F., Copp D. H., 1959. Progress and rate of absorption of radiostrontium through intestinal tracts of rats. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 102, p. 514.

Cruess R. L., Clark I., 1965. Alterations in the lipids of bone caused by hypervitaminosis A and D. «Biochem. J.», v. 96, p. 262.

Cruess R. L., Clark I., 1967. Effect of hypervitaminosis D upon the phospholipids of metaphyseal and diaphyseal bone. «Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.», v. 126, p. 8.

Cruess R. L., Clark I., 1971. The effect of vitamin D deficiency on the lipids of bone matrix. «Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.», v. 136, p. 415.

Cruickshank E. M., Kodicek E., 1955. The vitamin D content of tissues of rats irradiated with ultraviolet light. «Proc. Nutr. Soc.», v. 14, № 2, p. 8.

Cruickshank E. M., Kodicek E., Armitage P., 1953. Vitamin D balance and distribution in rats given a massive dose of ergocalciferol. «Biochem. J.», v. 54, p. 337.

Cruickshank E. M., Kodicek E., Armitage P., 1954, The vitamin D content of tissues of rats given ergocalciferol. «Biochem. J.», v. 58, p. 172.

Czarnowska-Misztal E., Zull J. E., De Luca H. F., 1966. Response to vitamin D in adrenalectomized amimals. «Nature», v. 210, p. 96.

Danielli J. E., Davson H. 1935. A contribution to the theory of permeability of thin films. «J. Cell. and Comp. Physiol.», v. 5, № 4, p. 495.

Davoren P. R., Peter R., Sutherland E. W., 1963, The cellular location of adenyl cyclase in the pigeon erythrocyte. «J. Biol. Chem.», v. 238, p. 3 016.

Debre R., Brissand H., 1949. Action toxique de la vitamin D_2 administre a doses trop forter cher l'infants. «Ann. Med.», v. 50, p. 417.

De Duve C., Wattiaux R., Wibo M., 1962. Effects of fat-soluble compounds on lysosomes in vitro. «Biochem. Pharmacol.», v. 9, p. 97.

De Duve C., Wattiaux R., Wibo M., 1963. Effects of fat-soluble compound on lysosomes in vitro. «Proc. Internat. Pharmacol. Meet.», v. 5, p. 97.

Dehnen W., Dirscherl W., 1966. Die Wirkung von Vitamin D_3 and Dihydrotachysterin auf die Serum-eiwess beim Kaninchen. «Arzneimittel-Forsch.», Bd. 16, № 7, S. 827.

De Luca H. F., 1967. Mechanism of action and metabolic fate of vitamin D. «Vitamins and Hormones», v. 25, p. 315.

De Luca H. F., 1969a. 25-Hydroxycholecalciferol, the probable metabolically active form of vitamin D. «Amer. J. Clin. Nutr.», v. 22, № 4, p. 412.

De Luca H. F., 1969b. Recent advances in the metabolism and function of vitamin D. «Federat. Proc.», v. 28, № 5, p. 678.

De Luca H. F., 1969c. 25-Hydroxycholecalciferol. «Arch. Int. Med.», v. 124, № 4, p. 442.

De Luca H. F., Engström G., Rasmussen H., 1962. The action of vitamin D and parathyroid hormone in vitro on calcium uptake and release by isolated kidney mitochondria. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», v. 48, p. 604.

De Luca H. F., Gran F. C., Steenbock H., 1957a. Vitamin D and citrate oxidation. «J. Biol. Chem.», v. 224, p. 201.

De Luca H. F., Gran F. C., Steenbock H., Reiser S., 1957b. Vitamin D and citrate oxidation by kidney mitochondria. «J. Biol. Chem.», v. 228, p. 469.

De Luca H. F., Lund J., Rosenbloom A., Lobeck C., 1967. Vitamin D_3, metabolism in rickets. «J. Pediat.», v. 70, p. 828.

De Luca H. F., Reiser S., Steenbock H., Kaesberg P., 1960. Vitamin D and the structure of kidney mitochondria. «Biochim. Biophys. Acta», v. 40, p. 526.

De Luca H. F., Steenbock H., 1957. An in vitro effect of vitamin D on citrate oxydation by the kidney mitochondria. «Science», v. 126, p. 258.

Dent C. E., Lewis A. A., Wolstenholme G. E. W., 1954. The kidney. London.

Deuel H. J., 1951. The Lipids; their chemistry and biochemistry. In: «Interscience Publishers». N. Y., p. 772.

De Wind L. T., 1961. Hypervitaminosis D with osteosclerosis. «Arch. Dis. Child.», v. 36, p. 373.

Dickens F., 1940. The citric acid content of animal tissues. «Chemistry and Industry», v. 59, p. 135.

Dickens F., 1941. The citric acid content of animal tissue with reference to its occurance in bone and tumor. «Biochem. J.», v. 35, p. 1011.

Dikshit P. K., Joshi J. G., Patwardhan V. N., 1956. The influence of vitamin D on the citric acid content and citrogenase activity of rachitic epiphyseal cartilage of albino rat. «Indian. J. med. Res.», v. 44, p. 719.

Dimroth K., Paland J., 1939. Uber die Ultravioletbestrahlung des $\Delta^{5,7}$-Androst-adien-diols-(3,17). «Ber. at Ver. Volshyg.», Bd. 72, S. 187.

Dolmierski R., 1965. Zaburzenia psychiczne wywolane hipervitaminoza D. «Neurol. neurochirurg. i psychiatr. polska», v. 15, № 6, p. 859.

Dowdle E. B., Schachter D., Schenker H., 1960. Requrement for vitamin D for the active transport of calcium by the intestine. «Amer. J. Physiol.», v. 198, p. 269.

Drescher D., De Luca H. F., 1971. Possible precursor of vitamin D stimulated calcium binding protein in rats. «Biochemistry», v. 10, № 12, p. 2 307.

Drescher D., De Luca H. F., Imrie M. H., 1969. On the site of discrimination of chicks against vitamin D_2. «Arch. Biochem. and Biophys.», v. 130, № 1—2, p. 657.

Dumont P. A., Curran P. F., Solomon A. K., 1960. Calcium and strontium in rat small intestine. Their fluxes and their effect on Na flux. «J. Gen Physiol.», v. 43, p. 1119.

Eaton R. H., Moss D. W., 1967. Organic pyrophosphates as substrates for human alkaline phosphatases. «Biochem. J.», v. 105, p. 1307.

Ebel A., Hermetet J. C., Bollack C., Mandel P., 1971. Histoenzymological study of aortic medial necrosis induced by vitamin D in the rabbit aorta. «Rev. Eur. Etud. Clin. et Biol.», v. 16, № 1, p. 35.

Ebel J. G., Taylor A. N., Wasserman R. H., 1969. Vitamin D-induced calcium-binding protein of intestinal mucosa. «Amer. J. Clin. Nutr.», v. 22, № 4, p. 431.

Eisenstein R., Dedmon R., Papajiannis S., Hemmens A., 1962. Effect of hypervitaminosis D on serum factors in the rabbit. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 109, p. 482.

Eisenstein R., Groff W. A., 1957. Experimental hypervitaminosis D: hypercalcemia, hypermucoproteinemia and metastatic calcification. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 94, № 3, p. 441.

Eisenstein R., Passavoy M., 1964. Actinomycin D inhibits parathyroid hormone and vitamin D activity. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 117, p. 77.

Eisenstein R., Zernolis L., 1964. Vitamin D-induced aortic calcification. «Arch. Pathol.», v. 77, p. 27.

Engfeldt B., Rhodin J., Standh J., 1962. Studies of the kidney ultra-structure in hypervitaminose D. «Acta Chir. Scand.», v. 123, p. 145.

Ericson L. E., 1968. Degranulation of the parafollicular cells of the rat thyroid by vitamin D_2 induced hypercalcemia. «J. Ultrastruct. Res.», v. 24, p. 145.

Evanson J. M., Garner A., Lumb G. A., Stanbury S. W., 1966. Observations on the action of thyrocalcitonin. «J. Bone Surg.», v. 48, p. 387.

Fellers F. X., 1959. Idiopathic hypercalcemie of infancy and vitamin D metabolism. «Helv. Paediat. Acta», v. 14, p. 483.

Felsenfeld G., Sandine G., 1962. UV-properties of nucleic acids. «J. Molec. Biol.», v. 5, p. 407.

Fischer J. A., Binswanger U., Schenk R. K., Merz W., 1970. Histological observations on bone in intestinal malabsorption and vitamin D deficiency. «Hormone and Metabol. Res.», v. 2, p. 110.

Follis R. H., 1956. Studies on hypervitaminosis D. «Amer. J. Clin. Pathol.», v. 26, p. 400.

Forstner G. G., Sabesin S. M., Isselbacher K. J., 1968. Rat intestinal microvillus membranes. Purification and biochemical characterization «Biochem. J.», v. 106, p. 381.

Foster G. V., 1968. Calcitonin. A review of experimental and clinical investigation. «Postgrad. med. J.», v. 44, p. 411.

Frankel S., Vasumura S., 1971. Changes in the thyroidal content of thyrocalcitonin produced by vitamin D in rats. «Endocrinology», v. 88, № 1, p. 267.

Fraser D., Geiger D. W., Munn J. D., Slater P. E., Jahn R., Liu E., 1958. Calcification studies in clinical vitamin D-deficient and in hypophosphataemic vitamin D-refractory rickets: The induction of calcium deposition in rachitic cartilage, without the administration of vitamin D. «Amer J. Dis. Child.», v. 96, p. 460.

Fraser D. R., Kodicek E., 1966. The synthesis of vitamin D esters in the rat. «Biochem J.», v. 100, p. 67.

Fraser D. R., Kodicek E., 1968. Enzyme studies on the esterification of vitamin D in rat tissues. «Biochem. J.», v. 109, № 3, p. 457.

Fraser D. R., Kodicek E., 1970. Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite. «Nature», v. 228, № 5 273, p. 764.

Freeman S., Chang T. S., 1950. Effect of thyroparathyroidec-

tomy and vitamin D on serum calcium and citric acid of normal and nephrectomized dogs. «Amer. J. Physiol.», v. 160, p. 341.

Friedman W. F., 1968. Congenital cardiovascular anomalies and vitamin D. «Heart Bull.», v. 17, № 6, p. 101.

Friedman W. F., Roberts W. S., 1966. Vitamin D and the supravalvar aortic stenosis syndrome. The transplacental effects of vitamin D on the aorta of the rabbit. «Circulation», v. 34, № 1, p. 77.

Frolik C. A., De Luca H. F., 1971. 1,25-Dihydroxycholecalciferol: The metabolite of vitamin D responsible for increased intestinal calcium transport. «Arch. Biochem. and Biophys.», v. 147, № 1, p. 143.

Gaillard P. J., 1967. Bone culture studica with thyrocalcitonin. «Proc. Konikl. Ned. Akad. wetenschap. ser.», v. 70, p. 309.

Gekle D., Ströder J., Rostock D., 1969. The effect of vitamin D on the inorganic phosphate reabsorption in the proximal convolution of the rat kidney. «Klin. Wochenschr.», Bd. 47, № 21, S. 1177.

Gekle D., Ströder J., Rostock D., 1971. The effect of vitamin D on renal inorganic phosphate reabsorption of normal rats, parathyroidectomized rats and rats with rickets. «Pediat. Rec.», v. 5, № 1, p. 40.

Ghosh N. K., Fishman W. H., 1968. L-phenylalanine inhibition of rat intestinal alkaline phosphatase: A homosteric phenomenen. «Arch. Biochem. Biophys.», v. 126, p. 700.

Gier J. D., Haest C. W. N., Manderslooi J. G., Van Deenen L. L. M., 1970. Valinomycin-induced permeation of $^{86}Rb^{+}$ of liposomes with varying composition through the bilayers. «Biochem. Biophys. Acta», v. 211, p. 373.

Gillman T., Grant R. A., Hathorn M., 1960. Histochemical and chemical studies of calciferol-induced vascular injuries. «Brit. J. Exptl. Pathol.», v. 41, p. 1.

Gittes R. F., Toverud S. U., Cooper C. W., 1968. Effects of hypercalcemia and hypocalcemia on the thyrocalcitonin content of the rat thyroid glands. «Endocrinology», № 82, p. 83.

Gittlman J. F., Pincus J. B., 1940. Rickets associated with amorfism, glycusuria, ketonuria and albuminuria. «Amer. J. Dis. Child.», v. 60, № 6, p. 1351.

Glimcher M. J., 1959. Molecular biology of mineralized tissues with particular reference to bone. In: «Biophisical Science. A Study Program». N. Y., p. 359.

Gounelle J. C., Raoul Y., 1964. Interrelations surrenales-vitamine D dans l'absorption calcique. «Compt. rend. Soc. biol.», v. 158, № 4, p. 690.

Grab W., 1936. Die Auswertung der antirachitischen Wirksamkeit neuer Sterinderivate im Versuch an Ratten und Küken. «Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.», Bd. 243, S. 63.

Grant R. A., Hathorn M., Gillman T., 1961. The inhibitory effect of 2,4-dinitrophenol on metastatic tissue calcification induced by calciferol. «Biochem. J.», v. 81, p. 352.

Greaves J. D., Schmidt C. L. A., 1933. The role played in bile in the absorption of vitamin D in the rat. «J. Biol. Chem.», v. 102, p. 101.

Guroff G., De Luca H. F., Steenbock H., 1963. Citrate and action of vitamin D on calcium and phosphorus metabolism. «Amer. J. Physiol.», v. 204, p. 833.

Gurr M. I., Finean J. B., Hawthorne J. N., 1963. Phospholipids of liver cell fractions. I. Phospholipid composition of the liver cell nucleus. «Biochim. Biophys. Acta», v. 70, p. 406.

György P., 1929. Die Behandlung und Verhutung der Rachitis und Tetanie. Berlin.

Haddad J. G., Boissean V., Avioli L. V., 1971. Placental transfer of vitamin D_3 and 25-hydroxycholecalciferol in the rat. «J. Lab. and Clin. Med.», v. 77, № 66, p. 908.

Hallick R. B., De Luca H. F., 1969. Vitamin D_3-stimulated template activity of chromatin from rat intestine. «Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.», v. 63, № 2, p. 528.

Harmeyer J., De Luca H. F., 1969. Calcium-binding protein and calcium absorption after vitamin D administration. «Arch. Biochem. and Biophys.», v. 133, № 2, p. 247.

Harris L. J., 1956. Vitamin D and bone. In.: «Biochemistry and physiology of bone». N. Y., p. 581.

Harris H., 1968. Nucleus and Cytoplasm. Oxford.

Harrison M. T., 1964. Interrelationships of vitamin D and parathyroid hormone in calcium homeostasis. «Postgrad. Med. J.», v. 40, p. 497.

Harrison H. E., Harrison H. C., 1960. Transfer of Ca^{45} across intestinal wall in vitro in relation to action of vitamin D and cortisol. «Amer. J. Physiol.», v. 199, p. 265.

Harrison H. E., Harrison H. C., 1963. Theories of vitamin D action. In: «The Transfer of Calcium and strontium Across Biological Membranes». Ed. R. H. Wasserman. N. Y., p. 229.

Harrison H. E., Harrison H. C., 1965. Vitamin D and permeability of intestinal mucosa to calcium. «Amer. J. Physiol.», v. 208, p. 370.

Harrison H. E., Harrison H. C., 1966. Actinomycin D inhibition of intestinal transport of calcium and of vitamin D action. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 121, p. 312.

Harrison H. E., Harrison H. C., Park E. A., 1958. Vitamin D and citrate metabolism: Effects of vitamin D in rats fed diets adequate in both calcium and phosphorus. «Amer. J. Physiol.», v. 192, p. 432.

Haslewood G. A. D., 1939. The action of light on substances related to ergosterol. «Biochem. J.», № 33, p. 454.

Hass G. M., Landerholm W., Hemmens A., 1966. Production of calcific athero-arteriosclerosis and thromboarteritis with nicotinae, vitamin D and dietary cholesterol. «Amer. J. Pathol.», v. 49, № 4, p. 739.

Hass G. M., Trueheart R. E., Taylor C. B., Stumpl M., 1958. An experimental histologic study of hypervitaminosis D. «Amer. J. Pathol.», v. 34, № 3, p. 395.

Hassel O., Ottar B., 1947. The structure of molecules containing cyclohexane or pyranose rings. «Acta Chem. Scand.», v. 1, p. 929.

Hassel O., Viervoll H., 1947. Electron diffration investigations of molecular structures. II. Results obtained by the rotating sect or method. «Acta Chem. Scand.», v. 1, p. 49.

Haussler M. R., Boyce D. W., Littledike E. T., Rasmussen H., 1971. A rapidly acting metabolite of vitamin D_3. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», v. 68, № 1, p. 177.

Haussler M. R., Myrtle J. F., Norman A. W., 1968. The association of a metabolite of vitamin D_3 with intestinal mucosa chromatin in vivo. «J. Biol. Chem.», v. 243, № 15, p. 4054.

Haussler M. R., Nagode L. A., Rasmussen H., 1970. Induction of intestinal brush border alkaline phosphtase by vitamin D and identity with Ca-ATP-ase. «Nature», v. 288, № 5277, p. 1199.

Haussler M. R., Norman A. W., 1967. The subcellular distribution of physiological doses of vitamin D_3. «Archs. Biochem. Biophys.», v. 118, № 1, p. 145.

Haussler M. R., Norman A. W., 1969. Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», v. 62, № 1, p. 155.

Havinga E., Botts J. P. L., 1954. Studies on vitamin D. I. The synthesis of vitamin D_3-C^{14}. «Recl. Trav. chim. Pays-Bas Belg.», v. 73, p. 393.
Havivi E., 1971. Lysosomal enzymes in cartilage and new bone in rachitic chicks. «Isr. J. Med. Sci», v. 7, p. 532.
Havivi E., Bernstein D. S., 1969. Lipid metabolism in normal and rachitic rat epiphyseal cartilage. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 131, p 1300.
Helbig W., 1968. Über die Beeinflussung der Fettsaureoxydation durch Steroide und Steroid-derivate. «Die Nahrung», Bd. 12, S. 535.
Helbock H. J., Forte J. G., Saltman P., 1966. The mechanism of calcium transport by rat intestine. «Biochim. Biophys. Acta», v. 126, p. 81.
Hendler R. W., 1971. Biological membrane ultrastructure. «Physiol. Rev.», v. 51, № 1, p. 66.
Herrman R. G., Parker R. J., 1963. Effect of dihydrotachysterol (AT-10) and epinephrine on serum and tissue cholesterol and calcium levels. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 114, № 2, p. 331.
Hertelendy F., Taylor T. G., 1960. On the interaction between vitamin D and parathyroid hormone in the domestic fowl. «Biochem. Biophys. Acta», v. 44, p. 200.
Hess A. F., Benjamin H. R., Gross J., 1931. The source of excess calcium in hypercalcemia induced by irradiated ergosterol. «J. Biol. Chem.», v. 94, p. 1.
Hess A. F., Weinstock M., 1924. Antirachitic properties imparted to inert fluids and to green vegetables by ultraviolet irradiation. «J. Biol. Chem.», v. 62, p. 301.
Hess A. F., Weinstock M., 1925. A further report on importing antirachitic properties to inert substances by ultraviolet irradiation. «J. Biol. Chem.», v. 63, p. 297.
Heymann W., 1936. Studies on the mode of action and the metabolism of vitamin D. «J. Pediat.», v. 8, p. 480.
Heymann W., 1937. Metabolism and mode of action of vitamin D. Storage of vitamin D in different tissues. «J. Biol. Chem.», v. 118, p. 371.
Hibberd K. A., Norman A. W., 1969. Comparative biological effects of vitamins D_2 and D_3 and dihydrotachysterol$_3$ in the chick. «Biochem. Pharmacol.», v. 18, № 10, p. 2347.
Hiertquist S., 1964a. Microchemical analysis of glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) in normal and rachitic epiphyseal cartilage. «Acta Soc. med. upsaliensis», v. 69, p. 23.
Hiertquist S., 1964b. The glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) of the epiphyseal plates in normal and rachitic dogs. Studies using a column procedure with cetylpyridinum chloride. «Acta Soc. med. upsaliensis» v. 69, p. 83.
Higaki M., Takahashi M., Suzuki T., Sahashi Y., 1965a. Distribution of vitamin D sulfokinase in animal tissues and its isolation. «J. Vitaminol.», v. 11, p. 266.
Higaki M., Takahashi M., Suzuki T., Sahashi Y., 1965b. Biogenesis of vitamin D sulfate in animal tissues. «J. Vitaminol.», v. 11, p. 261.
Hirsch P. F., Munson P. L., 1969. Thyrocalcitonin. «Physiol. Rev.», v. 49, № 3, p. 548.
Holdsworth E. S., 1965. Vitamin D_3 and calcium absorption in the chick. «Biochem. J.», v. 96, p. 475.
Holdsworth E. S., 1970. The effect of vitamin D on enzyme activities in the mucosal cells of the chick small intestine. «J. Membrane Biol.», v. 3, № 1, p. 43.

H o l i c k M. F., S c h n o e s H. K., D e L u c a H. F., 1971a. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin D_3 metabolicaly active in the intestine. «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.», v. 68, № 4, p. 803.

H o l i c k M. F., S c h n o e s H. K., D e L u c a H. F., S u d a T., C o u s i n s R. J., 1971b. Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. «Biochemistry», v. 10, № 14, p. 2799.

H o n e t R., 1946. Recherches sur le metabolisme du calcium et du phosphore dans l'enfance. «Ann. Pediat.», v. 166, p. 177.

H o r s t i n g M., D e L u c a H. F., 1969. In vitro production of 25-hydroxycholecalciferol. «Biochem. Biophys. Res. Commun.», v. 36, p. 251.

H o s o y a N., F u j i m o r i A., W a t a n a b l e T., 1964. The action of vitamin D on the incorporation of P^{32} into phospholipids. «J. Biochem.», (Tokyo), v. 56, p. 613.

H o s o y a N., M o r i u c h i S., O o i z u m i K., 1970. Vitamins D_3 action on D, L-serine-3-^{14}C incorporation into phospholipid fractions with rat liver mitochondria. «J. Vitaminol». (Kyoto), v. 16, № 3, p. 190.

H o s o y a N., O k u T., 1971. Specific binding protein for active metabolites of vitamin D_3. «J. Vitaminol.», v. 17, № 2, p. 119.

H o s o y a N., W a t a n a b l e T., F u j i m o r i A., 1964. The action of vitamin D in vivo and in vitro on the incorporation of D, L-(3-C^{14})-serine into phosphatidylserine. «Biochem. Biophys. Acta», v. 84, № 6, p. 770.

H o w a r d J. E., N e y e r R. J., 1948. Intoxication with vitamin D. «J. Clin. Endocrinol.», v. 8, p. 895.

H u n t R. D., G a r s i a F. G., H e g s t e d D. M., 1969. Hypervitaminosis D in New World monkeys. «Amer. J. Clin. Nutr.», v. 22, № 3, p. 358.

H u r w i t z S., H a r r i s o n H. C., B u l l E. C., H a r r i s o n H. E., 1967. Comparison of the actions of vitamins D_2 and D_3 in the chick with their retention in serum, liver and intestinal mucosa. «J. Nutr.», v. 91, p. 208.

I l l i g R., P r a d e r A., 1959. Kasuistische Beitrage zur idiopatischen Hypercalcemie und Vitamin D-Intoxikation. «Helv. Paediat. Acta», Bd. 14, S. 618.

I m r i e M. H., N e v i l l e P. F., S n e l l g r o v e A. W., D e L u c a H. F., 1967. Metabolism of vitamin D_2 and vitamin D_3 in the rachitic chick. «Archs. Biochem. Biophys.», v. 120, № 3, p. 525.

I n h o f f e n H. H., I r m s c h e r K., 1959. Fortschritte der Chemie der Vitamin D und ihrer Abkommlinge. «Fortschr. Chem. org. Nortsoffe», Bd. 118, S. 71.

I r v i n g J. T., S c h i b l e r D., F l e i c h H., 1966. Effect of condensed phosphates on vitamin D-induced aortic calcification in rats. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 122, p. 852.

J o n x i s J. H. P., 1955. Amino-aciduria and rickets. «Helv. paediat. acta», v. 10, p. 245.

J o n x i s J. H. P., 1961. Some investigations on rickets. «J. Pediat.», v. 59, p. 607.

J o n x i s J. H. P., H u i s m a n T. H. J., 1953. Amino-aciduria in rachitic children. «Lancet», v. 265, p. 428.

J o s h i J. G., D i k s h i t P. K., P a t w a r d h a n V. N., 1957. Citrogenase and citric acid in dogs in induced rickets. «Indian J. med. Res.», v. 45, p. 439.

J u n g e-H ü l s i n g G., R a v e O., W a g n e r H., H u t h e r W., H i l d e n b e r g F., 1969. Beitrag zur Frage der Vitamin-D-Stossbehandlung. Untersuchungen über den Einfluss des Vitamins D auf den Bindegewebsstoffwechsel und den Mechanismus der extraossären Gewebsverkalkung. «Dtsch. med. Wochenschr.», Bd. 94, № 37, S. 1877.

Kallfelz F. A., Taylor A. H., 1967. Vitamin D-induced calcium binding factor in rat intestinal mucosa. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 125, № 1, p. 54.

Kaloud H., Stendte E., 1953. Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung der peroralen Stosstherapie mit dem kunstlichen Vitamin D_2 und dem naturlichen D_3 bei der Sauglingsrachitis. «Osterr. Z. Kinderheilk. Kinderfursorge», Bd. 9, S. 66.

Kaserer H. P., Gibitz H. J., Witontky O., 1966. Über eine tödliche Vitamin-D-Intoxikation beim Erwachsenen. «Wien. Klin. Wschr.», Bd. 73, № 25, S. 463.

Khoo E. C., Kowalewski K., 1965. Effect of actinomycin-D on calcium homeostasis. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 119, p. 946.

Kimberg D. V., 1969. Effects of vitamin D and steroid hormones on the active transport of calcium by the intestine. «New. Engl. J. Med.», v. 280, p. 1396.

Kleeman C. R., Rockney R. E., Maxwell M. H., 1958. The effect of parathyroid extract (PTE) on the renal clearance of diffusible calcium. «J. Clin. Invest.», v. 37, p. 907.

Kobayashi S., 1971. Acid mucopolysaccharides in calcified tissues. «Int. Rev. Cytol.», v. 30, p. 257.

Kobylinski S., 1969a. Experimenteller Vitamin-D-Schaden bei Kaninchen. I. Aorten-Herz-und Skelettveränderungen. «Exp. Pathol.», Bd. 3, № 2, S. 94.

Kobylinski S., 1969b. Experimenteller Vitamin-D-Schaden bei Kaninchen. II. Veränderungen der grossen Blutgefässe und der parencymatösen organe. «Exp. Pathol.», Bd. 3, № 4, S. 290.

Kobylinski S., 1971. Zur Pathogenese der Gewebsverkalkungen bei Vitamin-D-Intoxikation. «Exp. Pathol.», Bd. 5, № 3—4, S. 174.

Kodicek E., 1955. The biosynthesis of C^{14}-labelled ergocalciferol. «Biochem. J.», v. 60, p. 25.

Kodicek E., 1956. Metabolic studies on vitamin D. In: «Ciba Found. Symp. on Bone Struct. Metab.». London, p. 161.

Kodicek E., 1960. The metabolism of vitamin D. «Fourth Int. Congr. Biochem.», v. II, p. 198.

Kodicek E., 1963. Turnover and distribution of vitamin D and its mode of action. In: «The transfer of calcium and strontium across biological membranes». N. Y. — London.

Kodicek E., Ashby D. R., 1960a. The metabolism of C^{14}-labelled vitamin D_2 in the rat. «Biochem. J.», v. 75, p. 17.

Kodicek E., Ashby D. R., 1960b. The fate of physiological doses of C^{14}-labelled vitamin D_2 in normal and rachitic rats. «Biochem. J.», v. 76, p. 14.

Kodicek E., Darmady E. M., Stranack F., 1961. The localization of C^{14}-labelled vitamin D_2 in the nephron. «Clin. Sci.», v. 20, p. 185.

Kodicek E., Lawson D. E. M., Wilson P. M., 1970. Biological activity of a polar metabolite of vitamin D_3. «Nature», v. 228, № 5273, p. 763.

Kodicek E., Thompson G. A., 1965. Autoradiographic localization in bones of $I\alpha$-H^3-cholecalciferol. In: «Structure and funktion of connective and skeletal tissue». Eds. S. F. Jackson a. oth. London — Washington, p. 369.

Konetzki W., Hyland R., Eisenstein R., 1962. The sequentiol accumulation of calcium and acid mucopolysaccharides in nephrocalcinosis due to vitamin D. «Lab. Invest.», v. 11, № 6, p. 488.

Krawitt E. L., Kunin A. S., 1971. Intestinal calcium-binding protein and rickets. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 136, № 2, p. 530.

Krawitt E. L., Schedl H. P., 1968. In vivo calcium transport by rat small intestine. «Amer. J. Physiol.», v. 214, p. 232.
Kreitmair H., Moll T., 1928. Hypervitaminose durch grosse Dosen Vitamin D. «Münch. med. Wschr.», Bd. 75, S. 637.
Kunin A. S., Krane S. M., 1965a. Inhibition by puromycin of the calcium-mobilizing activity of parathyroid extract. «Endocrinology», v. 76, p. 343.
Kunin A. S., Krane S. M., 1965b. Utilization of citrate by epiphyseal cartilage of rachitic and normal rats. «Biochem. Biophys. Acta», v. 111, p. 32.
Langen C. D., Donath W., 1956. Vitamin D sclerosis of the arteries and danger of feeding extra vitamin D to older people, with aviem on the development of different forms of arteries sclerosis. «Acta med. Scand.», v. 156, p. 317.
Lawson D. E. M., 1971. Vitamin D: new findings on its metabolism and its role in calcium nutrition. «Proc. Nutr. Soc.», v. 30, № 1, p. 47.
Lawson D. E. M., Fraser D. K., Kodicek E., Morris H. R., Williams D. H., 1971a. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. «Nature», v. 230, № 5291, p. 228.
Lawson D. E. M., Pelc B., Bell P. A., Wilson P. W., Kodicek E., 1971b. Sinthesis of (1,2-$^3H_2$)-cholecalciferol and metabolism of (4-^{14}C, 1,2-$^3H_2$)-and (4-^{14}C, 1-^3H)-cholecalciferol in rachitic rats and chicks. «Biochem. J.», v. 121, p. 673.
Lawson D. E. M., Wilson P. W., Barker D. C., Kodicek E., 1969a. Isolation of chick intestinal nuclei. Effect of vitamin D_3 on nuclear metabolism. «Biochem. J.», v. 115, № 2, p. 263.
Lawson D. E. M., Wilson P. W., Kodicek E., 1969b. New vitamin D metabolite localized in intestinal cell nuclei. «Nature» (Engl.), v. 222, № 5189, p. 171.
Lenard J., 1970. Protein and glycolipid components of human erythrocyte membranes. «Biochemistry», v. 9, p. 1129.
Levy M., Sapir M., Mignon S. D., 1949. Doses massives de vitamine D cher l'adulte humain. «Bull. Soc. Chem. Biol.», v. 31, p. 200.
Lindholm H., 1944. Production and stability of pharmaceutical preparation containing D_2 and D_3 vitamins. «Arch. Pharm. Org. Chem.», v. 51, p. 715.
Loomis W. F., 1967. Shin-pigment regulation of vitamin D biosynthesis in man. «Science», v. 157, № 3788, p. 501.
Luca G., Feruglio G. A., 1964. Osservazioni elettrocardiografiche in dilci cosidi introssicazione da vitamina D. «Minerva pediatr.», v. 16, № 37, p. 1456.
Lumb G. A., Mawer E. B., Stanbury S. M., 1971. The apparent vitamin D resistance of chronic renal failure. «Amer. J. Med.», v. 50, № 4, p. 421.
Lund J., De Luca H. F., 1966. Biologically active metabolite of vitamin D_3 from bone, liver and blood serum. «J. Lipid. Res.», v. 7, p. 739.
Lund J., De Luca H. F., Horsting M., 1967. Formation of vitamin D esters in vivo. «Arch. Biochem. Biophys.», v. 120, p. 513.
Macciotta G., 1964. Considerazioni ed osservazioni sulla posizione del fattore proteico nella patogenesi delle varie espreasioni del rachitismo umano. «La clin. paediat.», v. 46, № 7, p. 583.
Mac Gregor R. R., Hamilton L. W., Cohn D. V., 1970. The induction of calcium binding protein biosynthesis in intestine by vitamin D_3 «Biohem. et Biophys. Acta», v. 222, № 2, p. 482.

Mankin G. J., Lippiello L., 1969. Nucleic acid and protein synthesis in epiphyseal plates of rachitic rats. «J. Bone and Joint Surg.», v. 51, № 5, p. 862.

Marcus C. S., Lengemann F. W., 1962. Absorption of Ca^{45} and Sr^{85} from solid and liquid food at various levels of the alimentary tract of the rat. «J. Nutr.», v. 77, p. 155.

Marmur J., Rownd R., Schildkrant C. L., 1963. Denaturation and renaturation of deoxyribonucleic acid. «Progr. in Nucl. Acid. Res.», v. 1, p. 231.

Martin D. L., De Luca H. F., 1969. Calcium transport and the role of vitamin D. «Arch. Biochem. Biophys.», v. 134, № 1, p. 139.

Martin D. L., Melancon M. J., De Luca H. F., 1969. Vitamin D stimulated, calcium-dependent adenosin triphosphatase from brusch borders of rat small intestine. «Biochem. Biophys. Res. Communs», v. 35, № 6, p. 819.

Mawer E. B., Backhouse J., Lumb G. A., Stanbury S. W., 1971a. Evidence for formation of 1,25-dihydroxycholecalciferol during metabolism of vitamin D in man. «Nature new Biol.», v. 232, № 32, p. 188.

Mawer E. B., Lumb G. A., Schaefer K., Stanbury S. W., 1971b. The metabolism of isotopically labelled vitamin D_3 in man: the influence of the state of vitamin D nutrition. «Clin. Sci.», v. 40, № 1, p. 39.

Mawer E. B., Lumb G. A., Stanbury S. A., 1969. Long biological halflife of vitamin D_3 and its polar metabolites in human serum. «Nature» (London), v. 222, p. 482.

McDonald F. G., 1936. The multiple nature of vitamin D. III. Irradiated 22-dihydroergosterol. «J. biol. Chem.», v. 114, p. IXV.

McLean F. C., 1957. The parathyroid hormone and bone. «Clin. Orthop.», v. 9, p. 46.

McLean F. C., Urist M. R., 1961. Bone: An introduction to the Physiology of skeletal tissue. Chicago.

Melancon M. J., De Luca H. F., 1969. Interrelationships between thyrocalcitonin, parathyroid hormone and vitamin D: control of serum calcium in hypervitaminosis D. «Endocrinology», v. 85, p. 704.

Melancon M. J., De Luca H. F., 1970. Vitamin D stimulation of calcium-dependent adenosine triphosphatase in chick intestinal brush borders. «Biochemistry», v. 9, № 8, p. 1658.

Melander A., Owman Ch., Sundler F., 1971. Concomitant depletion of dopamine and secretory granules from cells in the ultimobranchial gland of vitamin D_2-treated chicken. «Histochemie», v. 25, № 1, p. 32.

Meunier P., Thibaudet L., 1946. Sur les condidions de formation et de la vitamins D_2, ergocalciferol. «Acad. Sci. Paris», v. 223, p. 172.

Meyer J., Bolen R. J., Antin J., 1959. Vitamin D and citrate synthesis. «Archs. Biochem. Biophys.», v. 81, p. 340.

Migicovsky B. B., 1957. Influence of vitamin D on Ca^{++} resorption and accretion. «Can. J. Biochem. Physiol.», v. 35, p. 1267.

Migicovsky B. B., Emslie A. R. G., 1947. Interaction of calcium phosphorus and vitamin D. I. Influence of dietary calcium and phosphorus on body weight and bone ash of chicks. «Archs. Biochem. Biophys.», v. 13, p. 175.

Milhaud G., 1968. Utilisation of thyrocalcitonin in man in normal and pathological conditions. In: «Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin (Calcitonin)». Eds. R. V. Talmage and L. F. Belanger. Amsterdam, p. 86.

Milhaud G., Moukhtar M. S., Cherian A. G., Perault A. M., 1964. Inhibition de l'action hypercalcemiante de la parathormone par l'actinomycine D. «C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci». Paris, v. 259, p. 896.

Mirsky A. F., Pollister A. W., 1946. Chromosin a deoxyribase nucleoprotein complex of the cell nucleus. «J. Clin. Physiol.», v. 39, p. 117.
Morava E., Hegyi Z., Winter M., Tarjan R., 1971. Effect of vitamin D on hydroxyproline production of rat bones. «Acta Physiol. Acad. Sci. hung.», v. 39, p. 279.
Morgan A. F., Shimotori N., 1943. The absorption and retention by dogs of single massive doses of various forms of vitamin D. «J. Biol. Chem.», v. 147, p. 189.
Morii H., De Luca H. F., 1967. Relationship between vitamin D deficiency, thyrocalcitonin, and parathyroid hormone. «Amer. J. Physiol.», v. 213, p. 358.
Morii H., Lund J., Neville P. F., De Luca H. F., 1967. Biological activity of vitamin D metabolite. «Arch. Biochem. Biophys.», v. 120, p. 508.
Moriuchi S., Watanable T., Hosoya N., 1967. Subcellular localization of tritium labeled vitamin D_3 in rat intestinal mucosa. «J. Vitaminol.», v. 13, № 4, p. 322.
Myrtle J. F., Haussler M. R., Norman A. W., 1970. Evidence for the biologically active form of cholecalciferol in the intestine. «J. Biol. Chem.», v. 245, № 5, p. 1190.
Myrtle J. F., Norman A. W., 1971. Vitamin D: a cholecalciferol metabolite highly active in promoting intestinal calcium transport. «Science», v. 171, № 1, p. 79.
Nagode L. A., Frajola W. J., Loeb W. F., 1966. Enzyme activities of canine tissues. «Amer. J. Vet. Res.», v. 27, № 120, p. 1385.
Nair P. P., Bucana C., 1966. Intracellular distribution of vitamin D in rat liver. «Biochem. Biophys. Acta», v. 124, p. 254.
Nanba H., Fujita H., 1969. Fine structure of the thyroid parafollicular cells in normal, vitamin D and $CaCl_2$-treated mice. «Arch. histol. jap.», v. 30, p. 283.
Neuman W. F., Neuman M. W., 1958. The chemical dinamics of bone mineral. Chicago.
Neville P. E., De Luca H. F., 1966. The synthesis of (1,2-H^3)-vitamin D_3 and the tissue localization of a 0,25 μg (10 i. u.) dose per rat. «Biochemistry», v. 5, p. 2201.
Neville E., Holdsworth E. S., 1969. A «Second messenger» for vitamin D «FEBS Letters», v. 2, № 5, p. 313.
Nicolaysen R., 1937a. XIV studies on the mode of action of vitamin D. II. The influence of vitamin D on the fecal output of endogenous calcium and phosphorus in the rat. «Biochem. J.», v. 31, p. 107.
Nicolaysen R., 1937b. The influence of vitamin D on the absorption of calcium and phosphorus in the rat. «Biochem. J.», v. 31, p. 122.
Nicolaysen R., Eeg-Larsen N., 1953. The biochemistry and physiology of vitamin D. «Vitam. Horm.», v. 11, p. 29.
Nicolaysen R., Jansen J., 1939. Vitamin D and bone formation in rats. «Acta Paediat.», v. 23, p. 405.
Nichols G., Schartum S., Vaes G. M., 1963. Some effects of vitamin D and parathyroid hormone on the calcium and phosphorus metabolism of bone in vitro. «Acta Physiol. Scand.», v. 57, p. 51.
Norman A. W., 1965. Actinomycin D and the response to vitamin D. «Science», v. 149, № 3680, p. 184.
Norman A. W., 1966a. Actinomycin D effect on lag in vitamin D-mediated calcium absorption in the chick. «Amer. J. Physiol.», v. 211, № 3, p. 829.
Norman A. W., 1966b. Vitamin D-mediated synthesis of rapidly labeled RNA from intestinal mucosa. «Biochem. Biophys. Res. communs», v. 23, № 3, p. 335.

Norman A. W., 1968. The mode of action of vitamin D. «Biol. Rev.», v. 43, p. 97.

Norman A. W., 1971. Evidence for a new kindey-produced hormone 1,25-dihydroxycholecalciferol, the proposed biologically active form of vitamin D. «Amer. J. Clin. Nutr.», v. 24, № 11, p. 1346.

Norman A. W., De Luca H. F., 1963. The preparation of H^3-vitamins D_2 and D_3 and their localization in the rat. «Biochemistry», v. 2, № 5, p. 1160.

Norman A. W., De Luca H. F., 1964a. The subcellular location of H^3-vitamin D_3 in kidney and intestine. «Arch. Biochem. Biophys.», v. 107, № 1, p. 69.

Norman A. W., De Luca H. F., 1964b. Vitamin D and the incorporation of (1-^{14}C)-acetate into the organic acids of bone. «Biochem. J.», v. 91, p. 124.

Norman A. W., Haussler M. R., Adams T. H., Myrtle J. F., Roberts P., Hibberd K. A., 1969. Basic studies on the mechanism of action of vitamin D. «Amer. J. Clin. Nutr.», v. 22, № 4, p. 396.

Norman A. W., Lund J., De Luca H. F., 1964. Biologically active forms of vitamin D_3 in kidney and intestine. «Arch. Biochem. Biophys.», v. 108, № 1, p. 12.

Norman A. W., Mircheff A. K., Adams T. H., Spelvogel A., 1970. Studies on the mechanism of action of calciferol. III. Vitamin D-mediated increase of intestinal brush border alkaline phosphatase activity. «Biochem. Biophys. Acta», v. 215, № 2, p. 348.

Oku T., Moriuchi S., Hosoya N., 1971. Vitamin D_3 binding protein in rat intestinal mucosa. «J. Vitaminol.», v. 17, № 2, p. 81.

Olson E. B., De Luca H. F., 1969. 25-hydroxycholecalciferol: direct effect on calcium transport. «Science», v. 165, № 3891, p. 405.

Omdahl J., Holick M., Suda T., Tanaka Y., De Luca H. F., 1971. Biological activity of 1,25-dihydroxycholecalciferol. «Biochemistry», v. 10, № 15, p. 2935.

Ooizumi K., Moriuchi S., Hosoya N., 1970. Vitamin D dependent calcium binding protein in rat intestinal mucosa. «J. Vitaminol.», v. 16, № 3, p. 228.

Opienska-Blauth J., Gebala A., Sanecka-Obacz M., Kozlowska T., Stryjecca M., 1966. Aminoaciduria in bone disease in children. «Annales Paediatria», v. 207, № 2, p. 115.

Orimo H., Ohata M., Fujita F., 1970. In vivo effect of parathyroid hormone and/or calcitonin on the lysosomal enzyme activity of rat bone. «Endocrinol. Japan.», v. 17, p. 411.

Ornoy A., Nebel L., 1970. Effects of hypervitaminosis D_2 altered by pregnancy in rats. Hyperlipidemia and fatty liver degeneration with restrained injuries to the cardiovascular system and other organs. «Isr. J. Med. Sci.», v. 6, № 5, p. 622.

Orr W. J., Holt L. E., Wilkins L., Boone F. H., 1923. The calcium and phosphorus metabolism in rickets, with special reference to ultraviolet ray therapy. «Amer. J. Dis. Child.», v. 26, p. 362.

Padykula H. A., 1962. Recent functional interpretations of intestinal morphology. «Fed. Proc.», v. 21, p. 873.

Peterson T., Todd D. B., Edwards J. E., 1965. Supravalvular aortic stenosis. «J. Thorac. Cardiovasc. Surg.», v. 50, p. 734.

Ponchon G., De Luca H. F., 1969a. The role of the liver in the metabolism of vitamin D. «J. Clin. Invest.», v. 48, № 7, p. 1273.

Ponchon G., De Luca H. F., 1969b. Metabolites of vitamin D_3 and their biologic activity. «J. Nutr.», v. 99, p. 157.

Ponchon G., De Luca H. F., Suda T., 1970. Metabolism of

(1,2)-^{3}H-vitamin D_3 and (26,27)-^{3}H-25-hydroxyvitamin D_3 in rachitic chicks. «Arch. Biochem. Biophys.», v. 141, № 2, p. 397.

Ponchon G., Kennan A. L., De Luca H. F., 1969. Activation of vitamin D by the liver. «J. Clin. Invest.», v. 48, № 11, p. 2032.

Posner A. S., 1969. Crystal chemistry of bone mineral. «Physiol. Rew.», v. 49, p. 760.

Prelot M., Guerillot-Vinet A., Bazier R., 1958. Etude de l'action antirachitique de la cétone 250 et de sa forme enolique comparée á celle de la vitamine D_3 chez le poulet et le rat. «Arch. Sci. Physiol.», v. 12, p. 45.

Quarterman J., Dalgarno A. C., Adam A., Fell B. F., Boyne R., 1964. The distribution of vitamin D between the blood and the liver in the pig, and observations on the pathology of vitamin D toxicity. «Brit. J. Nutr.», v. 18, № 1, p. 65.

Raisz L. G., Niemann J., 1969. Effect of phosphate, calcium and magnesium on bone resorption and hormonal responses in tissue culture. «Endocrinology», v. 85, p. 446.

Ramalingaswami V., Sriramachari S., Dikshit P. K., Tupule P. G., Patwardhan V. H., 1954. Histochemical study of rachitic epiphyseal cartilage during healing in albino rat. «Indian. J. Med. Rec.», v. 8, p. 509.

Raoul Y., Aymard P., Gounelle J. C., 1970. Association des carences en calcium et an vitamine D en vue de l'obtention d'un rachitisme chez le rat. «J. Physiol.», v. 62 (Suppl.), № 1, p. 205.

Raoul Y., Gounelle J. C., 1958. Localization surrénalienne initiale de la vitamin D_3 aprés injection intraveineuse chez le rat. «Compt. Rend.», v. 247, p. 161.

Raoul Y., LeBoulch N., Baron C., Bazier R., Guerillot-Vinet A., 1956. Formes enolique et calcique de la "cétone 250" d'activité antirachituqe supérieure à celle du calciferol-3. «C. R. hebd. Séanc. Acad., Sci.», v. 242, p. 3004.

Raoul Y., LeBoulch N., Guerillot-Vinet A., Dulou R., Baron C., 1955. Structure stéroide à noyau B ouvert et oxygene du produit antirachitique obtenu par action d'une argile activee sur le cholesterol. «Comptes Rendus Ac. Sci.», v. 241, p. 1882.

Rasmussen R. S., 1943. The infra-red absorption spectrum and configuration of cyclohexane. «J. Chem. Phys.», v. 11, p. 249.

Rasmussen H., 1959. The influence of parathyroid function upon the transport of calcium in isolated sacs of rat small intestine. «Endocrinology», v. 65, p. 517.

Rasmussen H., 1961. Parathyroid hormone: nature and mechanism of action. «Amer. J. Med.», v. 30, p. 112.

Rasmussen H., Anast C., Arnaud C., 1967. Thyrocalcitonin, EDTA and urinary electrolyte excretion. «J. Clin. Invest.», v. 46, p. 746.

Rasmussen H., Arnaud C., Hawker C., 1964. Actinomycin D and the response to parathyroid hormone. «Science». N. Y., v. 144, p. 1019.

Rasmussen H., De Luca H. F., Arnaud C., Hawker C., von Stedingk M., 1963. The relationship between vitamin D and parathyroid hormone. «J. Clin. Invest.», v. 42, p. 1940.

Rasmussen H., Feinblatt J., 1971. The relationship between the actions of vitamin D, parathyroid hormone and calcitonin. «Calcified Tissue Res.», v. 6, p. 265.

Rauschkolb E. W., Davis H. W., Fenimore D. C., Black H. S., Fabre L. F., 1969. Identification of vitamin D_3 in human skin. «J. Invest. Dermatol.», v. 53, № 4, p. 289.

Rave O., Wagner H., Hüther W., Junge-Hülsing G., Hauss W. N., 1970. Risiko der Vitamin-D-Stossprophylaxe. Untersuchungen über den Einfluss des Vitamin D auf den Stoffwechsel der sulfatierten Mukopolysaccharide des Bindegewebes. «Münch. med. Wochenschr.», Bd. 112, № 1, S. 16.

Reich E., Franklin R. M., Shatkin A. J., Tatum E. L., 1961. Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production. «Science». N. Y., v. 134, p. 556.

Rikkers H., De Luca H. F., 1967. An in vivo study of the carrier proteins of ^3H-vitamins D_3 and D_4 in rat serum. «Amer. J. Physiol.», v. 213, № 2, p. 380.

Rikkers H., Kleitziens R., De Luca H. F., 1969. Vitamin D binding globulin in the rat: specifity for the vitamins D. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 130, № 4, p. 1321.

Rohr H. P., Hasler K., 1968. The parafollicular cells of the thyroid gland of the rat after stimulation by calcium acetate and vitamin D_3. «Experientia» (Basel), v. 24, p. 152.

Rosenheim O., Webster T. A., 1925. Rickets and cholesterol. «Lancet», v. 1, p. 1025.

Rosenheim O., Webster T. A., 1927. The photochemical production of vitamin D from ergosterol. «Lancet», v. 2, p. 622.

Rosenstreich S. J., Rich C., Volwiler W., 1971. Deposition in and release of vitamin D_3 brom body fat: evidence for a storage site in the rat. «J. Clin. Invest.», v. 50, № 3, p. 679.

Roszkiewicz J., Zawistowski S., Zegarska Z., 1970. Badania histologiczne i histachemiczne lozyska szczura bialego w doswiadczalnie wywolanej hiperwitaminozie D_3. «Folia morphol.» (PRL), v. 29, № 2, p. 259.

Rüziczka O., 1953. Klinische Untersuchungen bei Bitamin-D-Überdosierung. «Osterr. Z. Kinderhk. Kinderfursorage», Bd. 9, S. 4.

Sahashi Y., Suzuki T., Higaki M., Takahashi M., Asano T., Hasegawa T., Miyazawa E., 1967. Metabolic activities of vitamin D in animals. VI. Physiological activities of vitamin D sulfate. «J. Vitaminol.», v. 13, № 1, p. 37.

Sahashi Y., Suzuki T., Nishikawa T., Tanaka T., Takahashi M., Inaba S., Miyazawa E., 1962. Decrease of sulfate metabolism in vitamin D-deficient chicks. «J. Vitaminol.», v. 8, p. 121.

Sallis J. D., De Luca H. F., Rasmussen H., 1963. Parathyroid stimulation of phosphate uptake by rat liver mitochondria. «Biochem. Biophys. Res. Commun.», v. 10, p. 266.

Sallis J. D., Holdsworth E. S., 1962. Calcium metabolism in relation to vitamin D_3 and adrenal function in the chick. «Amer. J. Physiol.», v. 203, № 3, p. 506.

Sanders G. M., Pot J., Havinga E., 1969. Some recent results in the chemistry and stereochemistry of vitamin D and its isomers. «Fortschr. Chem. Organ. Natur.», v. 27, p. 131.

Scarpelli D. G., 1965. Experimental nephrocalcinosis. «Lab. Invest.», v. 14, p. 123.

Scarpelli D. G., Tremblay G., Pearse A. G. E., 1960. Comparative cytochemical and cytological study of vitamin D induced nephrocalcinosis. «Amer. J. Pathol.», v. 36, p. 331.

Schachter D., 1963. Vitamin D and the active transport of calcium by the small intestine. In: «The Transfer of Calcium and Strontium Across Biological Membranes». Ed. R. H. Wasserman. N. Y., p. 197.

Schachter D., Dowdle E. B., Schenker H., 1960. Active transport of calcium by the small intestine of the rat. «Amer. J. Physiol.», v. 198, p. 263.

Schachter D., Finkelstein J. D., Kowarski S., 1964. Metabolism of vitamin D. I. Preparation of radioactive vitamin D and its intestinal absorption in the rat. «J. Clin. Invest.», v. 43, № 5, p. 787.

Schachter D., Kimberg D. V., Schenker H., 1961. Active transport of calcium by intestine: Action and biol-assay of vitamin D. «Amer. J. Physiol.», v. 200, p. 1263.

Schachter D., Kowarski S., Reid P., 1967. Molecular basis for vitamin D action in the small intestine. «J. Clin. Invest.», v. 46, p. 1113.

Schachter D., Rosen S. M., 1959. Active transport of Ca^{45} by the small intestine and its dependence on vitamin D. «Amer. J. Physiol.», v. 196, p. 357.

Schaltegger H., 1960. Ergocalciferol-(C^{14}) hoher spezifischer Aktivität aus biologisch gleichförmig markiertem Ergosterol-(C^{14}). «Helv. chim. Acta», Bd. 43, S. 1148.

Schenk F., 1937. Über das kristallisierte Vitamin D_3 «Naturwiss.», Bd. 25, S. 159.

Schönholzer G., 1958. Toxikologie der D-vitamine. «Int. Zeitschr. für Vitaminforsch.», Bd. 7, S. 96.

Scott D., 1965. Factors influencing the secretion and absorption of calcium and magnesium in the small intestine of the sheep. «Quart. J. Exptl. Physiol.», v. 50, p. 312.

Sharma N. L., Anand J. C., 1965. Hypervitaminosis D. «Antiseptic», v. 62, p. 476.

Sheldon H., Robinson R., 1960a. Studies on rickets. I. The fine structure of uncalcified bone matrix in experimental rickets. «Ztschr. Zellforsch. Mikroskop. Anat.», Bd. 53, S. 681.

Sheldon H., Robinson M. A., 1960b. Studies on rickets. II. The fine structure of the cellular components of bone experimental rickets. «Ztschr. Zellforsch. Mikroskop. Anat.», Bd. 53, S. 685.

Shipley P. G., Kramer B., Howland J., 1925. Calcification of rachitic bone in vitro. «Amer. J. Dis. Child.», v. 30, p. 37.

Simmons D. J., Kunin A. S., 1971. RNA and mucopolysaccharide metabolism in rachitic cartilage and bone. «Isr. J. Med. Sci.», v. 7, № 3, p. 412.

Soliman H. A., Mac Intyre J., 1966. Mode of action of thyrocalcitonin. «J. Bone and Joint Surg.», v. 48, p. 385.

Stauffer M., Baylink D., Wergedal J., Rich C., 1969. Defective bone mineralization in calcium deficient rats. «Clin. Res.», v. 17, p. 293.

Steenbock H., 1924. The induction of growth promotive and calcifying properties in a ration by exposure to light. «Science», v. 60, p. 224.

Steenbock H., Black A., 1925. Fat-soluble vitamins. XXIII. The induction of growth-promoting and calcifying properties in fats and their unsaponiflabic constituents by exposure to light. «J. Biol. Chem.», v. 64, p. 263.

Steenbock H., Herting D. C., 1955. Vitamin D and growth. «J. Nutr.», v. 57, p. 449.

Steendijk R., 1961. The effect of a continuous intravenous infusion of inorganic phosphate on the rachitic lesions in cystinosis. «Arch. Dic. Child.», v. 36, p. 321.

Steendijk R., 1964. The effect of parathyroid extract on the serum concentrations of calcium and inorganic phosphate in active and healing rickets. «Acta Paediat.», v. 53, p. 105.

Stohs S. J., De Luca H. F., 1967. Subcellular location of vitamin D and its metabolites in intestinal mucosa after a 10—IU dose «Biochemistry», v. 6, № 11, p. 3338.

Stohs S. J., Zull J. E., De Luca H. F., 1967. Vitamin D stimulation of (H^3)-orotic acid incorporation into ribonucleic acid of rat intestinal mucosa. «Biochemistry», v. 6, № 5, p. 1304.

Studer A., Zbinden G., Uehlinger E., 1962. Die Pathologie der Avitaminosen. II. Hypervitaminose D. In: «Handbuch der Allgemeinen Pathologie». XI. Umwelt, II, Teil I, S. 476.

Suda T., De Luca H. F., Schnoes H. K., Blunt J. W., 1969. The isolation and identification of 25-hydroxyergocalciferol. «Biochemistry», v. 8, № 9, p. 3515.

Suda T., De Luca H. F., Schnoes H. K., Ponchon G., Tanaka Y., Holick M. F., 1970a. 21,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D_3 preferentially active on bone. «Biochemistry», v. 9, № 14, p. 2917.

Suda T., De Luca H. F., Schnoes H. K., Tanaka Y., Holick M. F., 1970b. 25, 26-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D_3 with intestinal calcium transport activity. «Biochemistry», v. 9, № 24, p. 4776.

Suda T., De Luca H. F., Tanaka Y., 1970c. Biological activity of 25-hydroxyergocalciferol in rats. «J. Nutrition», v. 100, p. 1049.

Suda T., Hallick R. B., De Luca H. F., Schnoes H. K., 1970d. 25-Hydroxydihydrotachysterols. Synthesis and biological activity. «Biochemistry», v. 9, № 8, p. 1651.

Sugai M., Matsuda J., 1968. The effect of vitamin D on transport of L-histidine by intestine. «Biochem. Biophys. Acta», v. 170, № 2, p. 474.

Sugai M., Matsuda J., 1971. Actinomycin D inhibition of intestinal transport of L-histidine and of vitamin D action. «Experientia», v. 27, № 1, p. 25.

Sutherland E. W., Oye J., Butcher R. W., 1965. The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase sistem in hormone action. «Recent Progr. Hormone Res.», v. 21, p. 623.

Tanaka Y., De Luca H. F., 1971a. Bone mineral mobilisation activity of 1,25-dihydroxycholecaciferol, a metabolite of vitamin D_3 «Arch. Biochem. Biophys.», v. 146, № 2, p. 574.

Tanaka Y., De Luca H. F., 1971b. Inhibition of the metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by actinomycin D or cyclohexemide. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», v. 68, № 3, p. 605.

Tanaka Y., De Luca H. F., Omdahl J., Holick M. F., 1971. Mechanism of action of 1,25-dihydroxycholecalciferol in intestinal calcium transport. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», v. 68, № 6, p. 1286.

Tanaka T., Takahashi M., Miyazawa E., Higaki M., Inaba S., Nishikawa T., Suzuki T., Sahashi Y., 1963. Action of vitamin D_3 in active sulfate metabolism of chicks. «J. Vitaminol.», v. 9, p. 62.

Tashjian A. H., 1965. Homeostasis of plasma calcium: effects of actinomycin D, parathyroidectomy and thyrocalcitonin. «Endocrinology», v. 77, p. 375.

Tashjian A. H., Ontjes D. A., Goodfriend T. L., 1964. Mechanisms of parathyroid hormone action: effects of actinomycin D on hormone-stimulated ion movements in vivo and in vitro. «Biochem. Biophys. Res. Commun.», v. 16, p. 209.

Taylor A. N., Wasserman R. H., 1965. A vitamin D_3-depedent factor influencing calcium binding by homogenates of chick intestinal mucosa. «Nature», v. 205, p. 248.

Taylor A. N., Wasserman R. H., 1967. Vitamin D_3-induced calcium binding protein: partial purification, electroforetic visualisation, and tissue distribution. «Arch. Biochem. Biophys.», v. 119, № 1—3, p. 536.

Taylor A. N., Wasserman R. H., 1970. Immunofluorescent localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein. «J. Histochem. Cytochem.», v. 18, p. 107.

Taylor A. N., Wasserman R. H., Jowsey J., 1968. A vitamin D-dependent calcium-binding protein in canine intestinal mucosa. «Federat. Proc.», v. 27, p. 675.

Thomas M., Albridge W. N., 1966. The inhibition of enzymes by beryllium. «Biochem. J.», v. 98, p. 94.

Thompson V. W., De Luca H. F., 1964. Vitamin D and phospholipid metabolism. «J. biol. Chem.», v. 239, № 4, p. 984.

Thompson G. R., Lewis B., Booth C. C., 1966. Absorption of vitamin-D_3-^3H in control subjects and patients with intestinal malabsorption. «J. Clin. Invest.», v. 45, № 1, p. 94.

Thompson G. R., Lewis B., Neale G., Booth C. C., 1965. Mechanisms of vitamin D deficiency in patients with lesions of the gastrointestinal tract. «Quart. J. Med.», v. 34, p. 486.

Toribara T. Y., Terepka A. R., Dewey P. A., 1957. The ultrafiltrable calcium of human serum. I. Ultrifiltration methods and normal values. «J. Clin. Invest.», v. 36, p. 738.

Toverud S. U., 1964. The effect of parathyroid hormone and vitamin D on serum calcium in rats. «Acta Physiol. Scand.», v. 62, p. 391.

Trummel C. L., Raisz L. G., Blunt J. W., De Luca H. F., 1969. 25-Hydroxycholecalciferol: stimulation of bone resorption in tissue culture. «Science», v. 163, p. 1450.

Trummel C. L., Raisz L. G., Hallick R. B., De Luca H. F., 1971. 25-Hydroxydihydrotachysterol$_3$-stimulation of bone resorption in tissue culture. «Biochem. Biophys. Res. Communs», v. 44, № 5, p. 1096.

Urban E., Harold S. P., 1969. Comparison of in vivo and in vitro effects of vitamin D on calcium transport in the rat. «Amer. J. Physiol.», v. 217, № 1, p. 126.

Urban E., Harold S. P., 1970. Vitamin D, tissue calcium and calcium transport in the in vivo rat small intestine. «Amer. J. Physiol.», v. 219, № 4, p. 944.

Vaes G., 1968. On the mechanism of bone resorption. «J. Cell. Biol.», v. 39, p. 676.

Vounoszai M. K., Schedl H. P., 1970. Vitamin D deficiency and neutral amino acid absorption in the rat intestine. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 134, № 2, p. 562.

Warkany J., Guest G. M., Grabill F. J., 1942. Estimation of vitamin D in blood serum. Vitamin D in human serum during and after periods of ingestion of large doses of vitamin D. «J. Lab. Clin. Med.», v. 27, p. 557.

Wasserman R. H., 1960. Metabolic basis of calcium and strontium discrimination: Studies with surviving intestinal segments. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 104, p. 92.

Wasserman R. H., 1963. Vitamin D and the absorption of calcium and strotium in vivo. In: «Transfer of Calcium and Strontium Across Biological Membranes». Ed. R. H. Wasserman. N. Y., p. 211.

Wasserman R. H., 1970. Interaction of vitamin D-dependent calcium binding protein with lysolecitin: Possible relevance to calcium transport. «Biochem. Biophys. Acta», v. 203, № 1, p. 176.

Wasserman R. H., Corradino R. A., 1971. Metabolic role of vitamins A and D. «Annu. Rev. Biochem.», v. 40, p. 501.

Wasserman R. H., Corradino R. A., Taylor A. N., 1968. Vitamin D-dependent calcium-binding protein. Purification and some properties. «J. Biol. chem.», v. 243, № 14, p. 3978.

Wasserman R. H., Kallfelz F. A., 1962. Vitamin D_3 and the unidirectional calcium fluxes across the rachitic chick diodenum. «Amer. J. Physiol.», v. 203, p. 221.
Wasserman R. H., Kallfelz F. A., Comar C. L., 1961. Active transport of calcium by rat duodenum in vivo. «Science», v. 133, p. 883.
Wasserman R. H., Taylor A. N., 1963. Vitamin D_3 inhibition of radiocalcium binding by chick intestinal homogenates. «Nature», v. 198, p. 30.
Wasserman R. H., Taylor A. N., 1966. Vitamin D_3-induced calcium binding protein in chick intestinal mucosa. «Science», v. 152, № 3723, p. 791.
Wasserman R. H., Taylor A. N., 1968. Vitamin D-dependent calcium binding protein: Response to some physiological and nutritional variables. «J. Biol. Chem.», v. 243, p. 3987.
Wasserman R. H., Taylor A. N., 1969. Some aspects of the intestinal absorption of calcium, with special reference to vitamin D. In: «Mineral Metabolism». Eds. C. L. Comar and F. Bronner. N. Y., v. 3, Chap. 5, p. 321.
Wasserman R. H., Taylor A. N., 1971. Evidence for a vitamin D_3-induced calcium-binding protein in New World primates. «Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.», v. 136, № 1, p. 25.
Wasserman R. H., Taylor A. N., Kallfelz F. A., 1966. Vitamin D and transfer of plasma calcium to intestinal lumen in chicks and rats. «Amer. J. Physiol.», v. 211, № 2, p. 419.
Weber J. C., Rous V., Kodicek E., 1971. The localization of 1,25-dihydroxycholecalciferol in bone cell nuclei of rachitic chicks. «Biochem. J.», v. 125, № 1, p. 147.
Wells J. C., Gambal D., 1968. A vitamin D-dependent serum factor promoting calcium uptake by bone. «Proc. Soc. Exptl Biol. Med.», v. 127, p. 1006.
Wells H., Lloyd W., 1968. Possible involvement of cyclic AMP in the actions of thyrocalcitonin and parathyroid hormone. In: «Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin (Calcitonin)». Eds. R. V. Talmage and L. F. Belanger. Amsterdam, Excerpta Med. Found., p. 332.
Werder F. V., 1939. Über Dihidro-tachysterin. «Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.», Bd. 260, S. 119.
Wergedal J. E., 1969. Enzymes of protein and phosphate catabolism in rat bone. II. Changes in vitamin D deficiency. «Calcifed Tissue Res.», v. 3, p. 67.
Wergedal J. E., Baylink D. J., 1969. Distribution of acid and alkaline phosphatase activity in undermineralized sections of the rat tibial diaphysis «J. Histochem. Cytochem.», v. 17, p. 799.
Wergedal J. E., Baylink D. J., 1971. Factors affecting bone enzymatic activity in vitamin D-deficient rats. «Amer. J. Physiol.», v. 220, p. 406.
Wergedal J. E., Baylink D. J., Stauffer M., Rich C., 1970. Bone formation, mineralization and resorption in phosphorus deficient rats. «Clin. Res.», v. 18, p. 188.
Whittier F. C., Freeman R. M., 1971. Potentiation of metastatic calcification in vitamin D-treated rats by magnesium. «Amer. J. Physiol.», v. 220, № 1, p. 203.
Wilson P. W., Lawson D. E., Kodicek E. M., 1967. The intracellular distribution of ($1-^3H$)-cholecalciferol in the intestine of vitamin D-deficient and supplemented rats. «Biochem. J.», v. 103, № 1, p. 165.
Windaus A., Buckholz K., 1938. Über ein Keton des Vitamin D_2. «Hoppe-Seyler's Z. physiol Chem.», Bd. 256, S. 273.

Windaus A., Linsert O., Lüttringhaus A., Weidlich G., 1932. Über das Krystallisierte Vitamin D_2 «Justus Liebigs Annln. Chem.», Bd. 492, S. 226.

Windaus A., Luttringhaus A., Deppe M., 1931. Über das krystallisierte Vitamin D_1. «Ann.», Bd. 489, S. 252.

Wong R. G., Adams T. H., Roberts P. A., Norman A. W., 1970. Studies on the mechanism of action of calciferol. IV. Interaction of the polyene antibiotic, filipin, with intestinal mucosal membranes from vitamin D-treated and vitamin D-deficient chicks. «Biochem. Biophys. Acta», v. 219, № 1, p. 61.

Zawistowski S., Roszkiewicz J., Obzycka A., Czupa B., 1970a. Badania histologiczne i histochemiczne w doswiadczalnie hiperwitaminozie D_3 «Folia morphol.», v. 29, № 4, p. 513.

Zawistowski S., Zegarska Z., Roszkiewicz J., Romankiewicz L., 1970b. Badania nad wplywem doswiadczalnei hyperwitaminozie D_3 naplody szcura bialego. «Folia morphol.», v. 29, № 3, p. 373.

Zull J. E., Cosimo S. G., 1969. Hydrogen binding of vitamin D and egg lecithin in the solid state. A possible molecular role for vitamin D in calicum binding by membranes. «Biochem. Biophys. Acta», v. 173, № 3, p. 409.

Zull J. E., Czarnowska-Misztal E., De Luca H. F., 1965. Actinomycin D inhibition of vitamin D action. «Science», v. 149, № 9, p. 182.

Zull J. E., Czarnowska-Misztal E., De Luca H. F., 1966a. On the relationship between vitamin D action and actinomycin-sensitive processes. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», v. 55, № 1, p. 177.

Zull J. E., Stohs S. J., DeLuca H. F., 1966b. The relationship between vitamin D action and actinomycin sensitive process. «Federat. Proc.», v. 25, p. 545.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение 3
Глава I. Физико-химические свойства и биологическая активность витамина Д 5
Глава II. Метаболизм витамина Д и его обменно-активные формы 15
Биосинтез витамина Д 16
Всасывание витамина Д 19
Транспорт витамина Д 23
Выделение витамина Д и его метаболитов из организма . . 26
Тканевое распределение витамина Д 31
Субклеточное распределение витамина Д 39
Метаболиты витамина Д 50
Глава III. Влияние витамина Д на метаболизм белка и нуклеиновых кислот 74
Взаимодействие витамина Д и актиномицина Д . . . 74
Регуляция витамином Д обмена нуклеиновых кислот . . 80
Участие витамина Д в регуляции обмена белка . . . 96
Глава IV. Влияние витамина Д на абсорбцию кальция в кишечнике 121
Физиологический механизм абсорбции кальция в кишечнике 122
Механизм действия витамина Д на абсорбцию кальция . . . 126
Глава V. Влияние витамина Д на метаболизм костной ткани 145
Глава VI. Токсическое действие витамина Д 161
Некоторые вопросы патогенеза, клиники и диагностики Д-гипервитаминоза 163
Минеральный обмен при гипервитаминозе Д 171
Углеводный обмен при гипервитаминозе Д 192
Механизм токсического действия витамина Д . . . 194
Заключение 201
Литература 206

Сергеев Павел Васильевич, Тажибаев Шамиль Сагинович, Сейфулла Рошен Джафарович.

ВИТАМИН Д

Утверждено к печати Ученым советом Института краевой патологии Министерства здравоохранения Казахской ССР

Редактор *А. Н. Ведерникова*
Худож. редактор *А. Б. Мальцев*
Техн. редактор *В. К. Горячкина*
Корректор *В. И. Андриасян*

* * *

Сдано в набор 10/VII 1974 г. Подписано к печати 28/X 1974 г. Формат 60×90 1/16. Бумага № 1. Печ. л. 14,8. Уч.-изд. л. 16. Тираж 1500. УГ08138. Цена 1 р. 76 к.

* * *

Типография издательства «Наука» Казахской ССР, г. Алма-Ата, ул. Шевченко, 28.
Зак. 90.

1р. 76к.

ВИТАМИН Д ВИТАМИН